

Die Isolierung
von Ergotamin und Ergocristin
aus saprophytischen Oberflächenkulturen
gewisser Clavicepstypen

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
zu Mainz

HEINZ RASSBACH
Mainz 1955

Die Isolierung von Ergotamin und Ergocristin
aus saprophytischen Oberflächenkulturen gewisser Clavicepstypen.

D i s s e r t a t i o n
z u r E r l a n g u n g d e s D o k t o r g r a d e s
bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
zu Mainz

eingereicht von
H e i n z R a s s b a c h
geboren in Wiesbaden

Mainz 1955

Dekan: Prof. Dr. H. Rohrbach

1. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Rochelmeyer

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 1955

Mit Genehmigung der Fakultät
zum Druck gekürzt

Meiner Frau !

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Rochelmeyer, möchte ich an dieser Stelle danken für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen und das wohlwollende Entgegenkommen, das er mir stets zuteil werden ließ.

Für sachliche Unterstützung bin ich der Kali-Chemie AG., Hannover, zu Dank verpflichtet.

Die Ausweitung der Indikationsgebiete von Mutterkornalkaloiden in der Medizin in den letzten zwei Jahrzehnten erhöhte den Bedarf an diesen Wirkstoffen beträchtlich. Die hierfür notwendige Menge an Droge wird in steigendem Maße durch den parasitischen Anbau von *Claviceps purpurea* auf Roggen eingebracht. Nachdem durch den Ungarn v. Bekesy das technische Problem der Massenimpfung von Getreidepflanzen gelöst worden war, hat dieser interessante Zweig des Arzneipflanzenanbaues rasche Fortschritte gemacht. Eine weitgehende Mechanisierung des parasitischen Anbaues von Mutterkorn hat vor allem das große Risiko der Wetterabhängigkeit auf ein erträgliches Maß reduziert. Dennoch ist dieser Umstand immer noch von entscheidender Bedeutung. Dazu kommt, daß vom Zeitpunkt der Planung des Anbaues bis zur Ernte resp. der Gewinnung der Wirkstoffe mehr als ein Jahr vergeht und damit ein wirtschaftliches Arbeiten erschwert ist. Wenn es also gelänge, den Pilz zu veranlassen, seine Alkaloide in saprophytischer Kultur zu bilden, wäre dies ein großer Fortschritt. Begreiflicherweise ist diese Frage schon mehrmals geprüft worden. So wurden die ersten Versuche zur saprophytischen Kultur (Züchtung "in vitro") des Pilzes *Claviceps purpurea* zu Ausgang des vorigen Jahrhunderts von B. Meyer (1), O. Brefeld (2) und zu Anfang dieses Jahrhunderts von C. Engelke (3) unternommen. Während die beiden ersten Autoren ihre Untersuchungen führten, nur mit der Absicht einen tieferen Einblick in die komplizierte Biologie des Pilzes zu bekommen, ist C. Engelke der erste, welcher die Vermutung ausspricht, daß die konidienbildende Vegetationsform in saprophytischer Kultur vielleicht in der Lage sei, die gleichen Wirkstoffe zu produzieren, wie sie der auf Gramineenarten parasitierende Pilzorganismus während seiner Entwicklung zum Sklerotium hervorbringt.

W. W. Bonns (4) kultivierte den Pilz ebenfalls saprophytisch; auch er hält eine Alkaloidbildung "in vitro" nicht für ausgeschlossen, obwohl ihm der Nachweis nicht gelang. L. Hecke (5) kultivierte *Claviceps purpurea* von Ascosporen ausgehend, während R. Falck (6) erstmalig aus dem Innern von Sklerotien steril entnommene Gewebestücken zur Anlage von Kulturen verwendete. Beiden Autoren diente die saprophytische Kultur lediglich zur Gewinnung von Konidien, mit deren Hilfe Roggen künstlich infiziert und damit Mutterkorn parasitisch erzeugt werden konnte. H. Kirchhoff (7) beschäftigte sich eingehend mit der Klärung gewisser Fragen, Biologie und Physiologie des Pilzes in saprophytischer Kultur betreffend. Bezüglich der Produktion von Alkaloiden macht der Autor jedoch keine Angaben. Erstmalig berichtet A. McCrea (8), daß es ihr gelungen sei, die Existenz von Alkaloiden in saprophytischen Kulturen durch den Hahnenkammtest nachzuweisen. Ferner wurden von ihr die Wirkung und die Einflüsse gewisser äußerer Faktoren wie Sauerstoffbedarf, Wärme, Feuchtigkeit, Belichtung und UV-Bestrahlung auf das saprophytische Wachstum untersucht. In einzelnen Kulturen wurde die Tendenz des Pilzgewebes erkannt, an gewissen Stellen Mycelverknötungen zu bilden. Solche Punkte bezeichnete A. McCrea als Pseudosklerotien. H. Kreitmair und W. Küssner (9) unternahmen gleichfalls Versuche zur Prüfung der Frage, ob durch den Pilz Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur stattfindet. Sie berichten, den Nachweis für die Existenz solcher Stoffe mittels allgemeiner Alkaloidreagenzien, der Sodaprobe und der Cornutinreaktion erbracht zu haben. Ferner gelang es ihnen, mit einer gewissen Menge eines salzsauren Extraktes die für die linksdrehenden, wasserunlöslichen Alkaloide spezifische Adrenalinumkehr am isolierten Kaninchenuterus zu demonstrieren. R. Jaretsky (10) züchtete den Pilz auf festem Nähragar in weitlumigen Reagenzgläsern. Nach einer gewissen Wachstumszeit wurde das Mycel samt Substrat mit Sand

zu einer homogenen Masse verrieben und einer ammoniakalischen Ätherextraktion unterworfen. Der Ätherrückstand gab mit dem Reagenz nach van Urk (11) eine Blaufärbung, die zur quantitativen Bestimmung Verwendung fand. Dabei erhielt der Autor Werte, welche sich nur unwesentlich von denen unterschieden, die er bei der biologischen Bestimmung durch Umkehr der Adrenalinwirkung am isolierten Kaninchenuterus ermitteln konnte. G. Krebs (12) wiederum konnte in seinen zahlreichen Kulturen niemals Alkaloide nachweisen.

G. Schweizer veröffentlichte im Jahre 1941 (13) seine Arbeit über die erfolgreiche Züchtung von *Claviceps purpurea* auf kaltsterilisierten Nährböden. Nach einem Wachstum von etwa 2 Monaten "sintert das Mycel zusammen" und beginnt sich schmutzig-violett zu verfärben. Die rund geformten festen Gebilde, deren Form durch die Kulturgefäße (Petri-Schalen) bedingt ist, sind nach G. Schweizer morphologisch als Sklerotien anzusehen. Der Autor berichtet sogar, es sei ihm gelungen, diese Formen zur Fruktifikation zu bringen. Mit der positiven Cornutinreaktion sah der Autor den Beweis für die Anwesenheit von Alkaloiden als erbracht an. Seine quantitativen acidimetrischen Bestimmungen ergaben mit Alkaloidgehalten von 0,219 % bis 0,38 % Werte, wie sie nur von guter Droge geliefert werden. S. J. Ritzema (14) behandelt in seiner Dissertation ausführlich die saprophytische Kultur von *Clavicepstypen*, welche mit einer Ausnahme auf Gräsern gefunden wurden. So dienten Kulturen von Gras-mutterkörnern, abstammend von *Lolium*, *Dactylis*, *Triticum repens*, *Molinia*, *Glyceria*, *Festuca*, *Alopecurus*, *Phleum* und *Secale cereale* zur Untersuchung. Dem Autor gelang es, in zwei Kulturen - von *Phleum* und *Molinia* - mit dem van Urk'schen Reagenz Alkaloide nachzuweisen. Mit einer weinsauren Extraktlösung aus der *Moliniakultur* konnte ferner eine Hemmung des Adrenalineffektes am Kaninchenuterus demonstriert werden. Es ist ohne größere Bedeutung, daß diese beiden Kulturen nicht von *Claviceps purpurea*, sondern einer verwandten Art, *Claviceps microcephala*, abstammten.

Auch E. Baldacci (15) konnte mit bestimmten Farbreaktionen (nach Tanret und Keller) sowie Fällungen mittels allgemeiner Alkaloidreagenzien Alkaloide in saprophytischer Kultur nachweisen. Die biologische Prüfmethode am isolierten Organ bewies jedoch nur die Anwesenheit uterotonischer Stoffe. Ein Adrenalinumkehrereffekt konnte nicht beobachtet werden. H. D. Michener und N. Snell (16) konnten mit dem Reagenz nach H. W. van Urk in den ätherischen Extrakten der von ihnen unter den verschiedensten Umweltbedingungen saprophytisch gezüchteten Pilzmycelien keine Mutterkornalkaloide nachweisen. Sie diskutieren zwar die Möglichkeit der Alkaloidbildung, glauben jedoch, daß solche Stoffe sofort wieder zerstört und abgebaut werden. Sie stützten ihre Meinung durch den Abbau von Ergotamintartrat, den sie beobachteten, wenn sie das Alkaloidsalz saprophytischen Kulturen zusetzten. K. Ogiu und K. Shimamoto (17) isolierten aus ihren saprophytisch gezüchteten Pilzmycelien zwei Substanzen in reiner kristalliner Form, von denen eine mit dem van Urk'schen Reagenz eine Blaufärbung erzeugt. Der Schmelzpunkt der betreffenden Verbindung wird mit 120° angegeben, wodurch der Stoff mit keinem der bisher bekannten Mutterkornalkaloide identisch sein kann, obwohl die Autoren ihn als "true ergot alkaloid" bezeichnen. Beide Substanzen sollen uterotonische Eigenschaften aufweisen bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 000 000. Ferner werden sie als oral wirksam gefunden, jedoch weisen die Präparate keine sympathikolytische Wirkung auf. 1949 erschien eine Veröffentlichung von M. Abe (18) und das sich darauf beziehende Japanische Patent No. 178336 vom 31.3.1949. Danach war es dem Autor gelungen, Wildformen von *Claviceps purpurea*, herkommend von *Agropyrum*- und *Trisetum*arten, in saprophytischer Kultur zur Alkaloidbildung zu bringen. M. Abe konnte das wirksame Prinzip isolieren, wobei es sich als Alkaloid von bisher unbekannter Zusammensetzung erwies. Es hatte die Summenformel $C_{16}H_{18}N_2$ und wurde auf Grund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften als neues Alkaloid

identifiziert. Die erzeugte Menge lag nach den Angaben bei 0,2 bis 0,6 g pro 100 g getrockneter Mycelsubstanz, während etwa 0,02 % bis 0,03 % ins Kulturfiltrat abgeschieden wurden. S. K. Sim und H. W. Youngken (19) bewiesen bei ihren Versuchen die Anwesenheit von Alkaloiden durch den Farbnachweis mit dem Alkaloidreagenz nach van Urk, und konnten am isolierten Organ mit ihren aus saprophytischen Kulturen stammenden Extrakten den Adrenalin-effekt hemmen. Sie weisen darauf hin, daß sich die Ausbeute an Alkaloiden durch Zusatz gewisser Stoffe wie Aminosäuren steigern lasse. V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) untersuchten zunächst die Wuchs- und Ernährungsbedingungen des Pilzes in submerser Kultur. In einer späteren Veröffentlichung (21) berichten sie, es sei ihnen weder kolorimetrisch noch chromatographisch gelungen, Alkaloide in saprophytischer Kultur nachzuweisen. M. Abe und Mitarbeiter (22) berichten im Laufe späterer Untersuchungen, sie hätten einen Pilzstamm gefunden, der in der Natur auf *Elymus mollis* parasitierend, in saprophytischer Kultur in der Lage sei, neben Ergokryptinin und Ergosinin, Agroclavin und ein weiteres neues Alkaloid, das Elymoclavine, zu erzeugen. (Es sei bemerkt, daß die Arbeiten von M. Abe und seinen Mitarbeitern erst in der zweiten Hälfte des Jahres 1952 zu meiner Kenntnis gelangten.) Bei der Konstitutionsaufklärung erwies sich diese neue Verbindung als ein Oxyagroclavin von der Formel $C_{16}H_{18}ON_2$. Die Substanz ist wasserlöslich und wird von den Autoren mit ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften genau beschrieben. L. Niedermaier (23) befaßte sich in seiner Dissertation ebenfalls mit der Klärung der Frage, ob *Claviceps purpurea* bei der Kultur "in vitro" fähig ist, Alkaloide zu synthetisieren. In etwa 10 % seiner Kulturreihen gelang es ihm, mit dem Aldehydreagenz Blaufärbungen hervorzurufen. Zu diesem Zweck schüttelte er seine nach ammoniakalischer Ätherextraktion resultierenden Lösungen mit wässriger Weinsäurelösung aus und versetzte diese mit dem

Reagenz. Eine der neuesten Arbeiten ist die von A. G. Paul, W. J. Kelleher und A. E. Schwarting (25). Die Autoren beschäftigen sich vorwiegend mit Stoffwechseluntersuchungen. Sie konnten trotz zusätzlicher Gabe von Verbindungen wie Tryptophan, Indol und Tryptophanderivaten, also Verbindungen, die wie die Lysergsäure und die sich von dieser ableitenden Mutterkornalkaloide im Molekül das Indolskelett besitzen, den Pilz zu keiner Alkaloidsynthese veranlassen.

Bei Betrachtung der bis zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Literatur über die Bildung von Mutterkornalkaloiden in saprophytischer Kultur von *Claviceps purpurea* oder verwandten Arten, lassen sich die Arbeiten in zwei Gruppen einteilen. In der einen gelang es, Alkaloide auf Grund chemischer Reaktionen (Farbreaktion nach van Urk, Fällung mit allgemeinen Alkaloidreagenzien) oder durch biologische Methoden (uterotonische Wirkung, Umkehr der Adrenalinwirkung am isolierten Organ) nachzuweisen. In der zweiten Gruppe, in welcher ebenfalls namhafte Autoren zu finden sind, wird eine Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur nicht beobachtet. Eine Erklärung für diese verschiedenartigen Beobachtungen könnte darin liegen, daß, da sowohl die angestellten chemischen und biologischen Nachweisreaktionen als nicht unbedingt spezifisch für Mutterkornalkaloide gelten, vielleicht Stoffe von der Art biogener Amine erfaßt worden wären. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müßte man die Alkaloide in kristalliner Form gewinnen und identifizieren. Unterstellt man aber, daß Mutterkornalkaloide in saprophytischer Kultur gebildet werden, so wäre es von großer Bedeutung zu wissen, warum zahlreichen Bearbeitern bis dahin ein Erfolg versagt blieb. Man könnte daran denken, daß einmal Umweltfaktoren oder zum anderen fehlende genetische Voraussetzungen oder beide in diesen Fällen die Ursache für den Mißerfolg gewesen wären.

So ergab sich die Problemstellung für vorliegende Arbeit in der Beantwortung folgender zwei Fragen:

1. Produzieren Typen von *Claviceps purpurea* in saprophytischer Kultur chemisch und physikalisch zu identifizierende Alkaloide?
2. In welchem Umfang sind hierbei Faktoren der Umwelt oder der Vererbung beteiligt?

Die Anlage saprophytischer Kulturen von *Claviceps purpurea* ist in der Literatur schon oft beschrieben. Da sie in vorliegendem Fall Vergleiche quantitativer Art ermöglichen sollten, mußten zunächst technische Details von Bedeutung auf ihre Eignung erprobt und einheitlich gestaltet werden. So erfolgte z. B. das Anlegen der Kulturen von sogenannten Stammkulturen ausgehend, deren Gewinnung aus verschiedenem Ausgangsmaterial möglich ist.

O. Brefeld (2) fing die von den Perithezien ausgeschleuderten Ascosporen unter besonderen Vorsichtsmaßregeln auf und ließ sie entweder in einer Nährlösung, oder auf Brot, das mit der Nährlösung getränkt war, auskeimen. B. Meyer (1) kultivierte den Pilz von Konidien ausgehend auf einem Dextrose-Pepton-Nährboden. Erstmals wies er auf gewisse morphologische Unterschiede bei der Entwicklung des Mycels hin, im Gegensatz zum analogen Sphaceliastadium auf der Wirtspflanze. C. Engelke (3) gelang es nicht, von Konidien ausgehend zu reinen Kulturen zu kommen, da sie immer stark mit Fremdinfectionen wie Schimmelpilzen u. ä. verseucht waren. Er fing daher die ausgeschleuderten Ascosporen steril auf. Die von ihm verwendete Nährlösung enthielt neben den anorganischen Salzen als Stickstoffquelle Ammoniumnitrat und als Kohlehydratquelle Dextrose. Der Autor beschreibt auf den Nährböden eine besondere Entwicklungsform des Pilzes, die er als Mikrosklerotienbildung bezeichnet. L. Hecke (5) kultivierte den Pilz, ausgehend von Ascosporen, auf Nährgelatine. R. Falck (6) benutzt erstmalig aus dem Innern von Sklerotien steril entnommene Gewebestückchen zur Anlage künstlicher Kulturen. Die Methode der sterilen Entnahme von Sklerotien Gewebe aus den inneren Partien der Mutterkörner wurde in der Folge von fast allen Autoren, die

sich mit der saprophytischen Kultur von *Claviceps* beschäftigten, angewendet. Die Vorteile dabei sind: Geringer apparativer Aufwand, mäßige Fremdinfectionsgefahr, schnelle Handhabung, jahreszeitliche Unabhängigkeit, weil die Verwendung von Konidien an das Vorhandensein von Honigtau gebunden ist. Benutzt man Ascosporen, so müssen die Sklerotien zur Fruktifikation, d. h. Ausbildung von Perithezien gebracht werden, was eine Kältepassage voraussetzt.

Die Methode der Verwendung von Sklerotienngewebe erfordert zunächst eine grobe Desinfektion. Die Mutterkörner werden in Sublimat gebeizt, die violette Rindenschicht entfernt und einzelne Scheibchen auf die Oberfläche des in Schräglage in Reagenzgläsern erstarrten Nähragars gebracht (Schrägagarröhrchen). Erwies sich dann im Laufe der folgenden Tage ein solches Sklerotienscheibchen als unsteril, während das im gleichen Röhrchen befindliche zweite Gewebestückchen schon "ausgekeimt" war, so konnte letzteres durch sofortige Übertragung auf ein neues Schrägagarröhrchen oft noch gerettet und damit die Weiterzuchtung der Type gesichert werden. Von allen Sklerotien, die von Roggen, Gerste oder Weizen abstammten, konnte ich auf diese Weise ohne besondere Schwierigkeit saprophytisches Mycel gewinnen. Ging ich dagegen von Grasmutterkorn aus, so konnte die Anlage der Stammkulturen nicht nach der eben beschriebenen Methode erfolgen. Die Sklerotien waren zu klein, als daß eine Desinfektion in Sublimatlösung mit anschließendem Abkratzen der Rindenschicht möglich gewesen wäre. Hier wurde so vorgegangen, daß die mit alkoholischer Formaldehydlösung desinfizierten Sklerotien ohne Abkratzen der Rindenschicht in Teilstückchen zerlegt wurden. Jedes wurde dann kurz durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen und sofort auf Schrägagarröhrchen überführt. Diese Art der Keimfreimachung von Ausgangssklerotien wurde nun beibehalten, wenn es sich um die Neuanlage von Kulturen handelte. Der Anteil der durch Fremdinfectionen unbrauchbaren

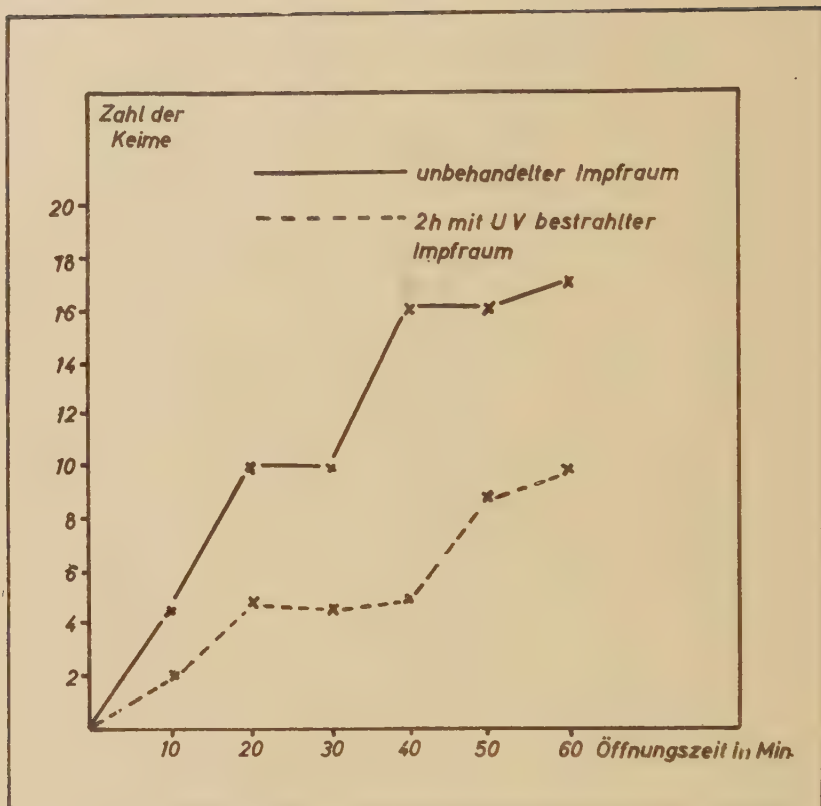
Kulturen war nicht höher als nach der bewährten Beizbehandlung mit Sublimatlösung. Weiter erwies es sich als zweckmäßig, sowohl die Anlage neuer Stammkulturen, als auch ihre Vermehrung sowie die Beimpfung größerer flüssiger Kulturserien in einem besonderen Arbeitsraum, einer Impfkabine durchzuführen. In diesem Impfraum wurde der vorhandene Fremdkeimpegel der Raumluft durch vorhergehende zweistündige Ausstrahlung mit ultravioletem Licht in erheblichem Maß gesenkt.

In der folgenden Tabelle I wird gezeigt, wie sich der Keimgehalt der Raumluft auf diese Weise vermindern ließ. Sie gibt wie die dazu gehörige graphische Darstellung die durchschnittliche Anzahl an Fremdkeimen pro Testagarplatte (Petrischalen mit $\varnothing = 9$ cm) in Abhängigkeit von der Öffnungszeit wieder. Zum Vergleich ist der Keimgehalt der Raumluft ohne jegliche Vorbehandlung aufgeführt. Aus den beiden Kurven ist ersichtlich, daß nach zweistündiger Ausstrahlung des Raumes, der Keimgehalt der Luft auf fast die Hälfte gesenkt wird. (Die für das sterile Arbeiten vorgesehene Arbeitskleidung wurde in der Impfkabine belassen und gleichermaßen ausgestrahlt.)

Tabelle I:

Nummer der Agarplatte:	Anzahl der sedimentierten Keime nach einer Öffnungszeit von:					
	10'	20'	30'	40'	50'	60'
1	6 (3)	8 (6)	9 (6)	19 (3)	16 (8)	18 (7)
2	2 (2)	11 (3)	8 (3)	12 (6)	20 (7)	21 (9)
3	5 (4)	11 (4)	12 (3)	16 (6)	14 (9)	15 (12)
4	4 (1)	13 (7)	10 (2)	19 (5)	13 (9)	9 (10)
5	3 (1)	7 (2)	6 (5)	11 (1)	14 (8)	19 (9)
Summe aller Platten:	20 (11)	50 (22)	47 (19)	77 (21)	77 (41)	82 (47)
Durchschnitt pro Platte:	4 (2-3)	10 (4-5)	9-10 (3-4)	15-16 (4-5)	15-16 (8-9)	16-17 (9-10)

Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Werte, die nach zweistündiger Ausstrahlung erhalten wurden.



Graphische Darstellung zu Tabelle I:

Zahl der sedimentierten Fremdkeime pro Petrischale
in Abhängigkeit von der Öffnungszeit.

Bei der Anlage von Folgekulturen aus den Stammkulturen (Schräglagararröhrchen) gewann ich den Eindruck, daß ihre Wachstumsgeschwindigkeit umso mehr zu wünschen übrig ließ, je älter die Stammkulturen waren. Dieser Frage wurde in den bisherigen Arbeiten der Literatur keine Aufmerksamkeit geschenkt. H. Kreitmair und W. Küssner (9) sowie M. L. Berman und H. W. Youngken (24) lassen offensichtlich ihr Impfmateriel nicht älter als 2-3 Wochen werden. H. D. Michener und N. Snell (16) stellen fest, daß ihre Stammkulturen bis 4 Monate lebensfähig bleiben. Sie bereiten zur Gewinnung von Impfmateriel von den Stammkulturen Sporensuspensionen und sagen aus, man könne diese mindestens 2 Monate im Kühlschrank keimfähig aufbewahren.

Aus der Arbeit von S. K. Sim und H. W. Youngken (19) geht hervor, daß die Autoren ihre Flüssigkulturen mit 3 bis 4 Wochen alten Stammkulturen anlegen.

V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) benutzten flüssige Schüttelkulturen, die in einem Alter von 7 Tagen von der Schüttelmaschine heruntergenommen wurden und als Impfmateri^{al} Verwendung fanden. Sie wurden im Kühlschrank konserviert und sollen mindestens 6 Monate lebensfähig bleiben.

Bei der Prüfung der Keimfähigkeit von Samen und insbesondere von Getreidekörnern wird zur Beurteilung ihre Fähigkeit Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan zu reduzieren mit Erfolg herangezogen. Ich habe diese Reaktion versucht zur Beurteilung von Stammkulturen zu verwenden. Da lebendes Gewebe nur auf Grund fermentativer Wirkung in der Lage ist, die Reduktion zu bewirken, schien es von Interesse, das Verhalten unterschiedlich alter Schrägagarkulturen zu untersuchen.

Die zu prüfenden Kulturen wurden senkrecht in ein Reagenzglasgestell gesetzt, der Wattestopfen entfernt und in jedes Röhrchen 10 ml einer 1 %igen wässrigen Triphenyltetrazoliumchloridlösung einpipettiert. Die bis zum Auftreten der ersten wahrnehmbaren Rotfärbung ablaufende Zeit in Minuten wurde graphisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, daß die Klonkultur K 90 auf den nur bezüglich des Peptons unterschiedlichen Nährböden I, II, und IV annähernd gleiches Verhalten aufweist. Nur auf dem mit Mannit als Kohlehydratquelle hergestellten Nähragar III tritt auch bei 4 Wochen alten Röhrchen die Rotfärbung genau so schnell auf, wie bei den jüngeren Kulturen.

Bei einem anderen Stamm (Ho) sind die Ergebnisse schwankender. Ob diese Tatsache darauf zurückzuführen ist, daß die Kultur sich wie eine Population verhält, oder ob andere Faktoren eine Rolle spielen, vermag ich nicht zu entscheiden.

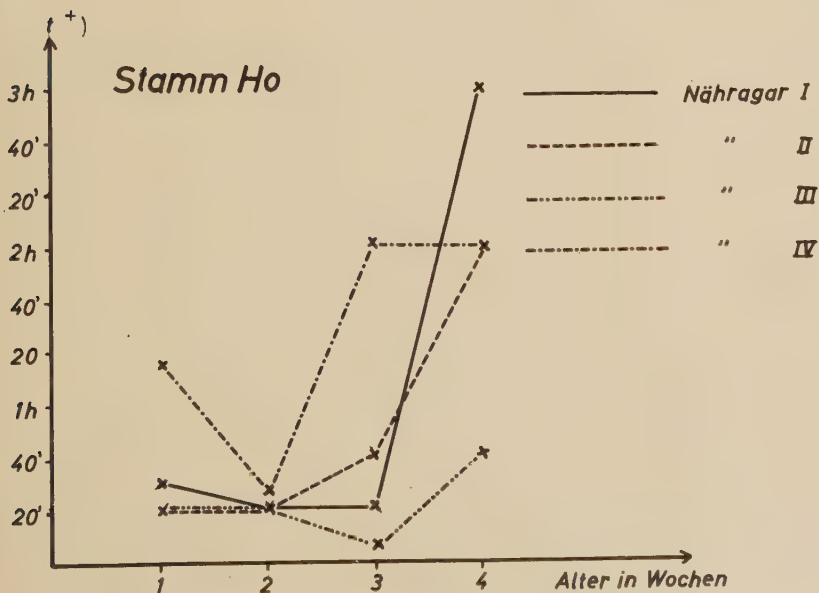
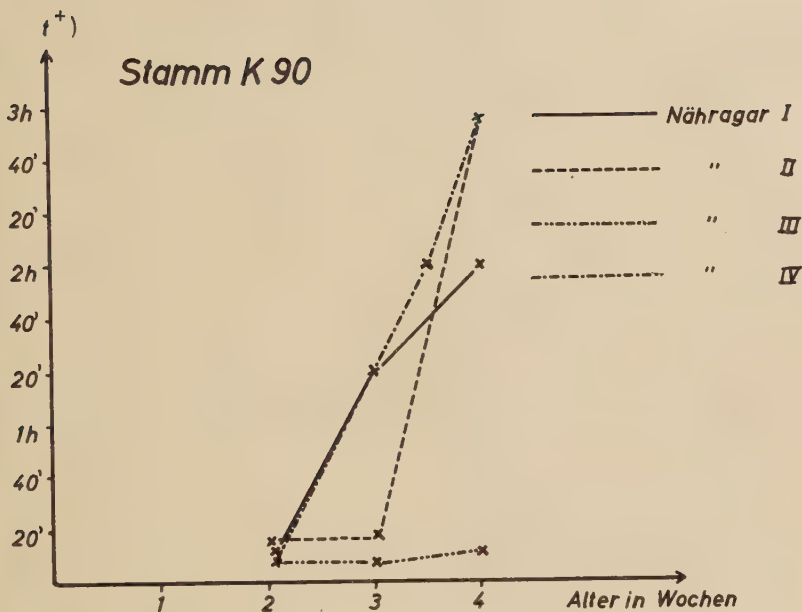
Allgemein wurde beobachtet, daß mit zunehmendem Alter der Schrägagarkulturen der Eintritt der Formazanreaktion später erfolgt (siehe Tabelle II). Damit in Übereinstimmung steht die Beobachtung, daß Stammkulturen nicht älter als drei Wochen sein sollen, um ein rasches Wachstum der Folgekultur zu ermöglichen.

Tabelle II:

Verwendeter Stamm:	Alter:	Eintritt der ersten wahrnehmbaren Rotfärbung in Minuten bei Verwendung der Nährböden: [†])			
		I	II	III	IV
K 90	7 d	10'	10'	10'	10'
K 90	14 d	10'	12'	10'	10'
K 90	21 d	80'	17'	6'	ca. 2 h
K 90	28 d	2 h	ca. 3 h	10'	ca. 3 h
Ho	7 d	30'	20'	20'	75'
Ho	14 d	20'	20'	20'	26'
Ho	21 d	20'	40'	5'	2 h
Ho	28 d	ca. 3 h	2 h	40'	2 h

[†]) Zusammensetzung der einzelnen Nährböden
(mit 2 % Agar):

Nährboden:	KH ₂ PO ₄ :	MgSO ₄ :	Dextrose:	Peptonart (u.Charge):	Mannit:	Ammon. Succinat:
I	0,1 %	0,025 %	10,0 %	2 % trypt. verdautes Fleisch-pepton (38 073)	-	-
II	0,1 %	0,025 %	10,0 %	2 % dto. aus Casein	-	-
III	0,1 %	0,03 %	-	-	5,0 %	0,8 %
IV	0,1 %	0,025 %	10,0 %	2 % Peptonum siccum e carne (229 847)	-	-



Graphische Darstellungen zu Tabelle II:

⁺) Schnelligkeit des Auftretens der Formazanreaktion in Abhängigkeit vom Alter der Kultur und der Zusammensetzung des Nährbodens.

Auch die Sterilisationstechnik wurde auf ihre Brauchbarkeit überprüft. Hier steht die Heißsterilisation mit gespanntem Wasserdampf im Vordergrund.

Die Methode der Kaltsterilisation wurde von G. Schweizer (13) beschrieben; es erscheint einleuchtend, daß eine solche Behandlung das natürliche Substrat besser erhält und man damit den physiologischen Ansprüchen des Pilzorganismus näher kommt. Da die Biosynthese der Alkaloide in der Natur möglicherweise erst durch Zusammenarbeit zwischen Pilz und Wirtspflanze zustande kommt, wären die hohen Alkaloidgehalte, welche G. Schweizer in seinen saprophytischen Kulturen findet, erklärlich. Eine Reproduktion seiner Versuche wird jedoch in der Literatur nicht beschrieben. Die Ergebnisse, insbesondere die Abbildungen in der Arbeit von G. Schweizer (13) waren für mich so beeindruckend, daß ich mich zunächst der Kaltsterilisation zuwandte. Auf keiner der nach den angegebenen Vorschriften hergestellten Kulturen konnte ich indessen ein Wachstum des Pilzes beobachten. Auch die sonst häufiger unter allen Fremdinfectionen auftretende Schimmelbildung war nicht festzustellen. Öffnete man die Petrischalen, so war ein charakteristischer saurer Geruch wahrnehmbar. Die wässrige Aufschwemmung eines solchen Substrates reagierte stark sauer. Es ist wahrscheinlich, daß gewisse Hefen oder Säurebakterien die Prozedur der Kaltsterilisation überlebt haben und Ursache der sauren Reaktion des Substrates waren. In wiederholten Versuchen konnte ich feststellen, daß weder durch Änderung des Sterilisationsmittels - also Verwendung von Methylenchlorid, Benzin, Benzol, Alkohol und Mischungen dieser - noch durch Verlängerung der Einwirkungsdauer dieser Lösungsmittel an den negativen Ergebnissen der Kaltsterilisation etwas geändert werden konnte. Somit gelang es mir nicht, die Ergebnisse von G. Schweizer zu reproduzieren, und ich beschränkte mich bei meinen weiteren Untersuchungen ausschließlich auf die Heißsterilisation flüssiger, bzw. fester Substrate.

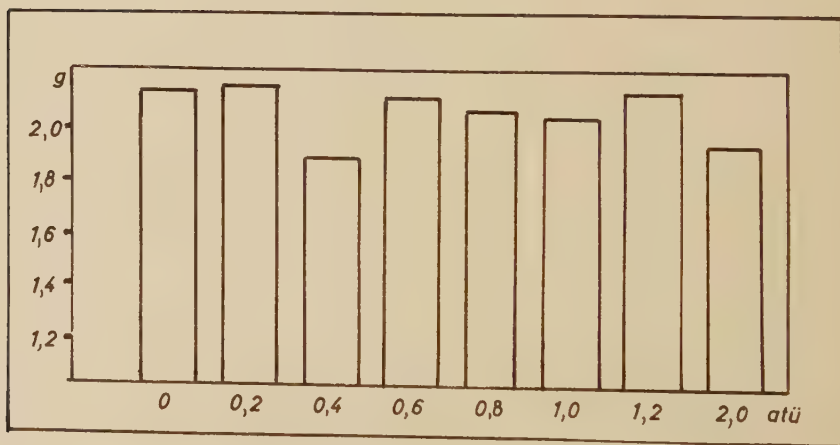
Die von den meisten Autoren angegebenen Sterilisationstemperaturen schwanken nur unwesentlich. In der Regel wird mit gespanntem Wasserdampf bei Temperaturen zwischen 110° und 120°

sterilisiert. Die Einwirkungszeit liegt zwischen 15 und 30 Minuten. Bei zu langer Sterilisationsdauer und bei zu hohen Temperaturen kann es bei peptonhaltigen Nährböden zu dunklen Verfärbungen kommen. H. D. Michener und N. Snell (16) beobachten diese Bräunung, die als "Maillard-Reaktion" bekannt ist. Von A. R. Patton, E. G. Hill und A. M. Foreman (26) wurde diese Erscheinung genauer untersucht und gedeutet, als Reaktion zwischen Glukose und essentiellen Aminosäuren, wie Tryptophan, Arginin und Lysin, die in der Hitze durch reduzierende Zucker inaktiviert werden. Die dunkel gefärbten, maillardierten Nährlösungen können auf den Wuchs gewisser Claviceps-Stämme hemmend wirken, brauchen es aber nicht. Ich fand bei meinen Untersuchungen Typen, die bei saprophytischer Kultur in einer zu hoch erhitzten und maillardierten Nährlösung keine Abnahme ihrer Wachstumsfreudigkeit zeigten.

Wie sich die Ausbeute an Trockenmycel bei einem Stamm (Klonkultur) als Funktion der Sterilisationstemperatur auswirkt, zeigen Tabelle III und die zeichnerische Darstellung. Jede Versuchsreihe bestand aus 10 Erlenmeyerkolben. Die errechneten Erntegewichte, bezogen auf 100 ml Nährlösung, sind die Durchschnittsgewichte der jeweiligen Versuchsreihe. Von diesen war K 253 insofern interessant, als diese Serie durch strömenden Wasserdampf ohne Überdruck bei 100° C keimfrei gemacht worden war. Diese Reihe hatte während der 7-wöchigen Wachstumsperiode durch Fremdinfection die höchsten Ausfälle mit 60 %. Die aus gleichem Grund zu verwerfenden Kolben bei den anderen Reihen hielten sich zahlenmäßig in erträglichen Grenzen. Durchschnittlich mußte pro Versuchsreihe ein Kolben entfernt werden. Dieser Prozentsatz erwies sich im Laufe der weiteren Untersuchungen, auch bei der Anlage größerer Kulturreihen, als weitgehend konstant. Aus diesen Versuchen geht mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit hervor, daß der von mir verwendete reinrassische Stamm in seinem Wachstum durch hohe Sterilisationsdrucke und -temperaturen, denen das Nährsubstrat ausgesetzt worden war, keine Beeinträchtigung erleidet.

Tabelle III:

Bezeichnung der Versuchsreihe:	Wuchszeit:	Sterilisationsdruck bzw. -temperatur:		Sterilisationszeit:	Durchschnittliches Mycel-trockengewicht: ⁺)
K 253	49 d	0	100°	15'	2,15 g
K 254	49 d	0,2 atü	105°	15'	2,16 g
K 255	49 d	0,4 atü	110°	15'	1,90 g
K 256	49 d	0,6 atü	114°	15'	2,12 g
K 257	49 d	0,8 atü	118°	15'	2,10 g
K 258	49 d	1,0 atü	121°	15'	2,08 g
K 259	49 d	1,2 atü	123°	15'	2,15 g
K 260	49 d	2,0 atü	134°	15'	1,97 g



Graphische Darstellung zu Tabelle III:

⁺) Durchschnittliches Myceltrockengewicht pro Kolben in Abhängigkeit vom Sterilisationsdruck.

Bei der Anlage von Folgekulturen kann auch die Impftechnik variiert werden. Viele Autoren arbeiten mit Impfnadeln, die vorne in einer Öse enden. Mit dieser wird Mycel abgekratzt und übertragen. V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20), die anfangs mit dem gleichen Gerät gearbeitet hatten, geben an, sie hätten bessere Erfolge mit einem sogenannten Impfnäpfchen, einem Schälchen mit ca. 0,8 ml Fassungsvermögen erzielt.

Anfangs verwendete ich ebenfalls eine Impfnadel. Beim Abheben des Pilzgeflechtes von der Oberfläche des Nähragars waren je nach Stamm deutliche Unterschiede festzustellen. Es gibt Kulturen, deren weiches, schwammiges Mycel sich mit Leichtigkeit vom Substrat abheben läßt. Andere hingegen bilden kräftiges und massives Hyphengewebe aus, von dem nur mit Mühe einzelne Teile abzutrennen sind. Meist läßt sich dabei ein Mitübertragen von altem Nährboden nicht vermeiden. Bei der Beimpfung mit solchen Mycelfetzen setzt das Wachstum in den flüssigen Kulturen nur zögernd und ungleichmäßig ein. Die mitübertragenen Konidien, meist am Hyphengewebe haften bleibend, sinken mit diesem unter und kommen unter wesentlich ungünstigeren Bedingungen zum Auskeimen, als wenn mit Sporensuspensionen geimpft wird, von denen noch berichtet werden wird. Die Methode der Beimpfung mit Gewebestückchen aus Schrägagarstammkulturen ist einfach durchzuführen und erfordert wenig Aufwand und Zeit. Mit einem Agarröhrchen lassen sich etwa 12 bis 15 flüssige Folgekulturen anlegen. Im Laufe weiterer Untersuchungen stellte sich nun heraus, daß immer die Folgekulturen schlechter angingen, welche mit einem Gewebestückchen aus dem oberen Teil der Schrägagarkultur belegt worden waren. An dieser Stelle ist der Nährboden ziemlich dünn, das Substrat scheint hier am ehesten an Inhaltsstoffen erschöpft und ausgelaugt zu sein. Das auf ihm wachsende Mycel stagniert aus Mangel an Nährstoffen in der Entwicklung, damit sinkt die Anzahl keimfähiger Konidien, die in ihm enthalten sind. Das langsame Wachstum solcher Kulturen, die mit von derartigen Stellen abstammenden Mycelfetzen beimpft worden waren, läßt sich damit zwanglos erklären. Da ein gleichmäßiges Wachs-

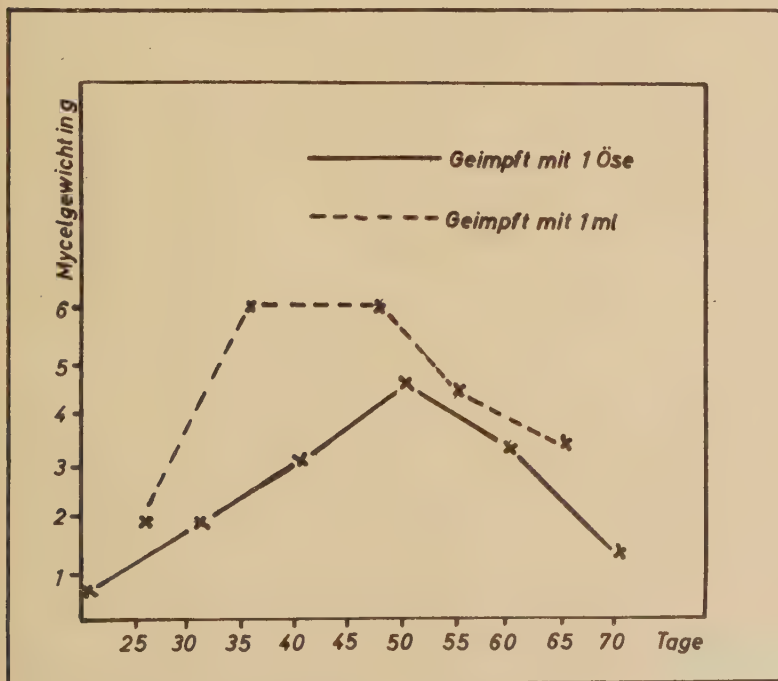
tum bestimmter Kultur- und Versuchsserien Voraussetzung für die Beantwortung weiterer Fragen war, mußte für eine gleichmäßige und konstante Beimpfung Sorge getragen werden. Hierzu schien mir das Arbeiten mit einer Sporensuspension geeignet zu sein. Ein Schrägagarröhrchen, was etwa $1/4$ seines Volumens an Nährboden enthält, wird mit 15 ml sterilem Wasser gefüllt. Mit einer Impfnadel kratzt man auf der Myceldecke in kreisenden Bewegungen die Konidien ab, dabei trübt sich die Flüssigkeit. Mit sterilen Pipetten wurden von dieser Aufschwemmung jeweils 1 ml zur Beimpfung der Kulturgefäße eingesetzt. Später zeigte sich, daß bereits 0,5 ml vollauf genügen, um ähnliche günstige Ergebnisse zu erzielen. Das mit 0,5 ml einer solchen Suspension einsetzende Wachstum ist viel gleichmäßiger als wenn mit Mycelfetzen geimpft wird. Bei Einsatz von etwa 0,5 ml Sporensuspension ist ein Röhrchen ausreichend zur Anlage von rund 25 Folgekulturen.

Daß die Menge der Konidienaufschwemmung, d. h. die in diesem Volumen enthaltene Anzahl keimfähiger Sporen, einen erheblichen Einfluß auf die Anfangsintensität des Wachstums hat, ist einleuchtend. Aus der nachfolgenden Tabelle IV und den davon sich ableitenden Kurvenbildern ist deutlich ersichtlich, um wieviel früher das Wachstum einsetzt, wenn statt mit einer Öse einer Sporenaufschwemmung, mit 1 ml dieser Suspension geimpft wird.

Bei dem beschriebenen Versuch bestand jede Untersuchungsreihe aus 12 Kolben, von denen jeweils 2 zu dem entsprechenden Zeitpunkt abgeerntet wurden. Durch Fremdinfection fielen in der 2. Versuchsreihe 2 Kolben aus, so daß nur 5 Mycelgewichtsbestimmungen durchgeführt werden konnten. Die Mycelgewichte sind, als Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen, nur mit Einschränkung zu werten. Dennoch ist aus den Kurven klar ersichtlich, wie groß der Einfluß der Impfarm auf die Gesamtwuchszeit ist.

Tabelle IV:

Stamm:	Nummer der Kolben:	Alter:	geimpft mit:	durchschnittliches Myceltrockengewicht: ⁺)
DK 011	1 + 2	20 d	1 Öse	0,5 g
DK 011	3 + 4	30 d	1 Öse	1,9 g
DK 011	5 + 6	40 d	1 Öse	3,1 g
DK 011	7 + 8	50 d	1 Öse	4,8 g
DK 011	9 + 10	60 d	1 Öse	3,5 g
DK 011	11 + 12	70 d	1 Öse	1,4 g
DK 011	1 + 2	25 d	1 ml	2,0 g
DK 011	3 + 4	35 d	1 ml	6,1 g
DK 011	5 + 6	47 d	1 ml	6,0 g
DK 011	7 + 8	55 d	1 ml	4,3 g
DK 011	9 + 10	65 d	1 ml	3,4 g



Graphische Darstellung zu Tabelle IV:

⁺) Durchschnittliches Myceltrockengewicht pro Kolben in Abhängigkeit von der zum Impfen eingesetzten Sporenmenge.

Die Frage nach dem günstigsten Nährboden ist keineswegs einfach zu beantworten. Sie ist sicher nicht nur eine Frage des kalorischen Wertes der Inhaltsstoffe. Vor der Anlage größerer Versuche müssen die individuellen Ernährungsbedürfnisse der jeweiligen Pilztypen, mit denen die Untersuchungen durchgeführt werden sollen, geklärt werden. Hierbei war es zunächst mein Bestreben, möglichst viel, d. h. große Mengen an Trockenmycel zu erzeugen, um die Frage der saprophytischen Alkaloidbildung beantworten zu können. Ich benutzte daher hauptsächlich den Dextrose-Pepton-Nährboden nach R. Jaretsky (10). Dieses Substrat ist mit 10 % Glukose und 2 % Pepton kalorisch hochwertig. In wenigen Versuchen und hauptsächlich zu Vergleichszwecken gelangte die Nährlösung nach H. Kirchhoff (7) zur Anwendung, desgleichen wurde der von M. Abe (18) empfohlene Nährboden auf seine Eignung untersucht. Über die optimalen Ernährungsbedingungen von *Claviceps purpurea* in saprophytischer Kultur gehen die Ansichten in der Literatur erheblich auseinander. Das gilt in erster Linie für die Kohlenhydraternährung. Während H. Kirchhoff (7) Verbindungen mit 6 Kohlenstoffatomen für geeignet hält, z. B. Monosaccharide vom Typ der Glukose und Fruktose oder Alkohole wie Mannit, sind nach seiner Ansicht Disaccharide weniger gut verwertbar, da sie erst nach Spaltung in ihre Komponenten resorbierbar würden. Rohrzucker sei noch brauchbar, Maltose und Laktose seien abzulehnen. Im Gegensatz zu dieser Meinung steht R. Jaretsky (10), welcher Maltose neben Dextrose und Mannit als gut geeignet ansieht. Der Autor weist mit Nachdruck darauf hin, daß man von einer guten Kohlenhydratquelle nur in Kombination mit einer günstigen Stickstoffquelle sprechen könne; das heißt die Ernährungsbedürfnisse des Pilzes sind keine einfache Summation der besten Einzelkomponenten, sondern voraussichtlich ein Komplex verschiedener zusammenwirkender Faktoren. H. D. Michener und N. Snell (16) propagieren Dextrose, Fruktose und Rohrzucker, während Maltose und Arabinose, ferner Dextrin sowie Stärke nach ihrer Meinung nicht in Frage kommen. S. K. Sim und H. W. Youngken (19)

widmen weniger der Art der Kohlenhydratquelle ihre Aufmerksamkeit, wie hauptsächlich dem Problem der Stickstoffernährung. In den von ihnen verwendeten Nährböden wurde durchweg Maltose verwendet. V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) meinen, Fruktose ließe sich günstig mit fast allen Stickstoffverbindungen kombinieren, desgleichen Mannit. Auch Dextrose und Saccharose seien noch brauchbar, während Maltose und Laktose abzulehnen seien. Die beiden Autoren zeigen überdies, wie der P_H -Wert der Nährlösung sich in den stärker sauren Bereich verschiebt, solange noch genügend Kohlenhydrate zum Bau- und Betriebsstoffwechsel vorhanden sind und veratmet werden können. Gleichzeitig nimmt das Mycelgewicht zu. Ist der Zucker nahezu verbraucht, stagniert das Wachstum, und die Reaktion im Kulturfiltrat verschiebt sich langsam rückläufig auf den Neutralpunkt zu. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß man keineswegs von einer oder mehreren geeigneten Kohlenhydratquellen sprechen könne, sondern die Anforderungen des Pilzorganismus dahingehend präzisieren müsse, als es für submerse Schüttelkulturen, mit denen sie ihre Untersuchungen durchführten, nur optimale Kombinationen zwischen Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen gäbe. Eine solche sei: Mannit und Caseinhydrolysat oder Lävulose und Sojahydrolysat. K. Ogiu und K. Shimamoto hingegen sagen wörtlich: "... the best sources of carbohydrate, which this fungus can assimilate are dextrose and mannitol ...". Auch M. Abe (18) züchtete seinen Pilz mit Erfolg auf mannithaltigen Lösungen. L. Niedermaier (23) gibt an, mit Rohrzucker, Dextrose oder Malz gearbeitet zu haben, äußert sich jedoch nicht weiter zur Frage der Eignung von Kohlenhydraten für eine erfolgreiche *Claviceps*-züchtung.

Ich beschränkte mich bei meinen Untersuchungen darauf, für die aus dem Sklerotium DK Oll abstammende Klonkultur, mit der ich in erster Linie meine Versuche anstellte, eine geeignete Kohlenhydratquelle zu finden. Diese Einsporkultur "K 90" wurde deshalb ausgewählt, weil sie sich inzwischen bei Anwendung der richtigen Stickstoffquelle als Alkaloide produzierend in saprophytischer Kultur erwiesen hatte.

Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 200 ml. Sie wurden mit 80 ml Nährlösung beschickt. Als Nährlösung gelangte die nach R. Jaretsky (10) mit 2 % Pepton zur Anwendung. Variiert wurde lediglich die Kohlenhydratquelle. Geprüft auf ihre Eignung in 10 %iger Konzentration wurden Rohrzucker, Maltose, Mannit, Dextrose und Fruktose. Aus den Abbildungen 1 bis 30⁺⁾ ist deutlich das unterschiedliche Wachstum der geprüften Klonkultur K 90 gegenüber den verschiedenen Zuckern zu erkennen.

Bereits nach einer Woche zeigte sich bei den Maltose oder Dextrose enthaltenden Versuchsreihen fast die ganze Substratoberfläche mit Mycel bedeckt. Bei den anderen Reihen waren nur punktförmige Anfänge zu erkennen. Das Wachstum auf Mannit konnte nur als äußerst dürftig bezeichnet werden. Nach zwei Wochen beginnt das Oberflächenmycel in der Dextrose- und in der Maltoseserie sich zum Wattenmycel umzuformen. Die restlichen drei Versuchsreihen bleiben demgegenüber in der Fortentwicklung zurück. Im Alter von drei Wochen sind die ersten Violettverfärbungen der Mycelien bei den üppig wachsenden Kulturen zu konstatieren. Bis zum Aberntetermin bleibt die Wachstumstendenz ziemlich gleich. Danach ergibt sich, daß für die Klonkultur K 90 Dextrose die geeignete, optimal ausnutzbare Kohlenhydratquelle in Verbindung mit einer bestimmten Peptonsorte ist. Fruktose scheint ähnlich gut resorbierbar zu sein. Maltose und Rohrzucker sind nur als brauchbar zu bezeichnen, Mannit scheint schlecht ausgenutzt zu werden. Die Mycelien aus diesen Versuchen wurden nach dem Abernten getrocknet, extrahiert und auf Wirkstoffe untersucht. In den Extrakten aus den Mycelien der Dextrose-, Fruktose- und Saccharoseserie konnte mit van Urk'schem Reagenz eine Blaufärbung erzeugt werden. Mit dem Extrakt aus dem Maltose- und Mannitmycel fiel die Reaktion negativ aus. Auf Grund dieser Versuche wurde bei allen folgenden Züchtungen dieser Type ausschließlich Dextrose als Kohlenhydrat verwendet.

^{+) Sämtliche im Text erwähnten und durchnumerierten Abbildungen befinden sich am Ende der Arbeit im Anhang.}

Da mit dem Verbrauch des Zuckers das Einsetzen der Autolyse zu erwarten ist, muß rechtzeitig abgeerntet werden. Mithin ist eine Dextrosebestimmung für die Festlegung dieses Termines Voraussetzung. H. D. Michener und N. Snell (16) berichten nur kurz über ihre Versuche zur Ermittlung des Zuckerverbrauches innerhalb einer Zuchtperiode. V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) erklären, es beständen Wechselbeziehungen zwischen Zuckerverbrauch und Mycelgewichtszunahme einerseits, sowie P_H -Änderungen im Kulturfiltrat andererseits und zwar im Sinne einer steigenden Acidität solange noch resorbierbarer Zucker vorhanden ist.

Meine orientierenden Vorversuche in dieser Richtung gingen von der Tatsache aus, daß die Dichte einer Lösung direkt proportional ist ihrem Zuckergehalt. Auch in verbrauchten, oder zum Teil verbrauchten Nährlösungen war diese Relation festzustellen. Die Dichte der Kulturfiltrate wird jedoch noch weitgehend von anderen Faktoren, wie Verdunstung, Gehalt an Stoffwechselprodukten des Pilzes u. ä. beeinflusst, so daß eine Dichtebestimmung allein nie einen genauen Wert bezüglich des noch vorhandenen Zuckers geben kann. Eine Feststellung, die ich aber immer wieder treffen konnte, war folgende: Eine frisch bereitete, sterilisierte Dextrose-Pepton-Nährlösung nach R. Jaretsky (10) hatte eine Dichte von 1,045. War dieser Wert nach einer gewissen saprophytischen Vegetationsperiode unter 1,010 abgesunken, so lagen höchstens noch Spuren von Zucker vor und der Aberntezeitpunkt war gegeben. Zur Bestimmung der noch vorhandenen Dextrose wendete ich zur Kontrolle die gravimetrische Methode nach Th. M. v. Fellenberg (27) an.

Aus der nachfolgenden Tabelle V läßt sich das direkte Abhängigkeitsverhältnis zwischen Zuckerverbrauch und Mycelbildung deutlich erkennen.

Tabelle V:

Stamm:	Wuchs- zeit:	End-P _H :	Dichte:	Prozentgehalt noch vorhan- dener Dextrose (Anfangswert = 100):	Trocken- mycel- gewicht:
DK 011	20 d	5,4	1,025	37,0 %	1,0 g
DK 011	30 d	5,4	1,007	10,5 %	3,0 g
DK 011	42 d	5,4	1,003	0,75 %	3,0 g
DK 011	50 d	5,8	1,005	Spuren	2,3 g
DK 011	60 d	6,8	1,005	-o-	1,7 g
K 90	29 d	5,4	1,006	weniger als 0,1 %	3,5 g
K 90	40 d	5,8	1,006	-o-	3,2 g
K 90	47 d	5,8	1,004	-o-	2,9 g
K 91	29 d	5,2	1,025	30,0 %	2,0 g
K 91	40 d	5,7	1,006	weniger als 0,1 %	2,6 g
K 91	62 d	6,8	1,000	-o-	1,6 g
K 92	29 d	5,4	1,030	41,0 %	1,5 g
K 92	40 d	5,4	1,016	14,4 %	1,9 g
K 92	62 d	7,0	1,004	-o-	1,6 g
K 93	29 d	5,2	1,033	44,0 %	1,5 g
K 93	40 d	5,4	1,006	weniger als 0,1 %	1,6 g
K 93	62 d	6,8	1,004	-o-	1,2 g

Das nach Verbrauch aller Zuckerreserven auftretende geringere Mycelgewicht, ist ein Beweis, daß der Pilz - gleichsam als Notmaßnahme - zur Selbstveratmung schreitet. Diese Autolyse tritt bereits in noch schwach saurem Medium auf. Ich konnte überhaupt nur selten alkalische Reaktion im Kulturfiltrat feststellen. In den wenigen Fällen, wo dies möglich war, die höchsten P_H-Werte lagen bei 8,0 bis 8,2, war nie ein Geruch nach

niederen Aminen aufgetreten. Wenn G. Schweizer (13) und H. Kirchhoff (7) derartiges festgestellt hatten, so mag bei ihren Kulturen die Autolyse noch erheblich weiter fortgeschritten gewesen sein.

Auch während des Wachstums blieben die gemessenen P_H -Werte recht gleichmäßig und schwankten nicht im entferntesten so stark, wie es V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) beobachtet haben. Immer wieder konnte ich feststellen, daß der nach dem Sterilisieren der Nährlösung ermittelte P_H -Wert von 5,4 sich nur geringfügig änderte. Diese weitgehende Konstanz führe ich in erster Linie auf das erhebliche Pufferungsvermögen des Peptons zurück. In anderen Versuchen, unter Verwendung der Nährlösung nach H. Kirchhoff (7), war zu Beginn des Wachstums und meist noch in den ersten vier Wochen der Vegetation stets erhebliche Versäuerung zu messen.

Aus der Tabelle V läßt sich unschwer erkennen, wie ähnlich in physiologischer Hinsicht K 90 der Stammkultur DK 011 ist. Beide erzeugen unter Ausnutzung aller Glukosevorräte in kurzer Zeit die höchsten Mycelgewichte. Wenn ich Dextrose als beste Kohlenhydratquelle bezeichnet habe und ferner während der saprophytischen Vegetation keine stärkere Acidität der Nährlösung messen konnte, so sehe ich darin keinen direkten Widerspruch zu den Befunden anderer Autoren. Deren Untersuchungsergebnisse sind zurückzuführen auf Kulturen, welche aus Sklerotien, also sicherlich Populationen, entwickelt worden sind. Es ist anzunehmen, daß die physiologischen Bedürfnisse solcher biologischen Konglomerate weniger einheitlich und konstant sind. Abgesehen von der Tatsache, daß ich meine Versuche weitgehend mit Einsporkulturen angestellt habe, sollte man nicht vergessen, daß es sich bei *Claviceps purpurea* um einen Organismus handelt, dem wir in saprophytischer Kultur nur unnatürliche Lebens- und Milieubedingungen bieten können. Die Lebensäußerungen solcher in gezwungene Richtung gelenkter Organismen dürfen vermutlich nur mit Einschränkung zu ihrer Kennzeichnung herangezogen werden.

Der Gedanke, Clavicepskulturen "in vitro" zusätzlich mit Sauerstoff zu versorgen, liegt nahe und wurde auch von einigen Autoren durchgeführt.

Man erreicht dies durch Schütteln der Kulturgefäße, wobei neben einer Vergrößerung der Atemoberfläche vermutlich die Diffusion verbrauchter Luft durch die Wattestopfen intensiviert wird.

Erwartungsgemäß reagierte der Organismus auf die Schüttelbehandlung mit erheblicher Wuchsgewichtssteigerung. H. D. Michener und N. Snell (16) erwähnen, daß der Ertrag auf das dreifache gegenüber der normalen Ruhekultur gestiegen sei. S. K. Sim und H. W. Youngken (19) konnten ihre Trockenmycelausbeute auf das siebenfache erhöhen, allerdings unter gleichzeitiger Abnahme der Alkaloidproduktion. V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) arbeiten bei ihren Stoffwechsel- und Ernährungsuntersuchungen grundsätzlich mit Submerskulturen. Solche Kulturformen entstehen beim Schütteln der Kolben. In Ruhe- oder Standkulturen bildet der Pulz nur Oberflächenmycel aus. L. Niedermaier (23) betont zwar, daß die Ernteerträge durch das Schütteln höher lägen, jedoch macht er keine Zahlenangaben. Er sieht in dem Erfolg durch diese Behandlung nur den Einfluß einer besseren Belüftung. Nach M. Abe (28) sind saprophytische Schüttelkulturen (submerged cultures) für die Alkaloidgewinnung ungeeignet. Sie steigern zwar das Wachstum, lassen jedoch die Ausbeute an Alkaloiden auf weniger als 1 % der Ausbeute bei Ruhekultur (surface culture) absinken.

In Versuchen kleinen Ausmaßes wollte ich daher den Einfluß einer intensiven Belüftung studieren. Ich benutzte eine kleine Laborschüttelmaschine, mit der ich je 6 Kolben gleichzeitig schütteln konnte. Von jeder Pilztype wurden zwei Kolben eine Woche lang ununterbrochen geschüttelt, während zwei gleichartige Standkolben zur Kontrolle dienten. Nach dieser Zeit wurden die Mycelien abgeerntet, getrocknet und gewogen.

Das durchschnittliche Trockengewicht aus den beiden Schüttelkolben wurde verglichen mit dem aus den Ruhekulturen. Tabelle VI und die zeichnerische Darstellung geben einen Über-

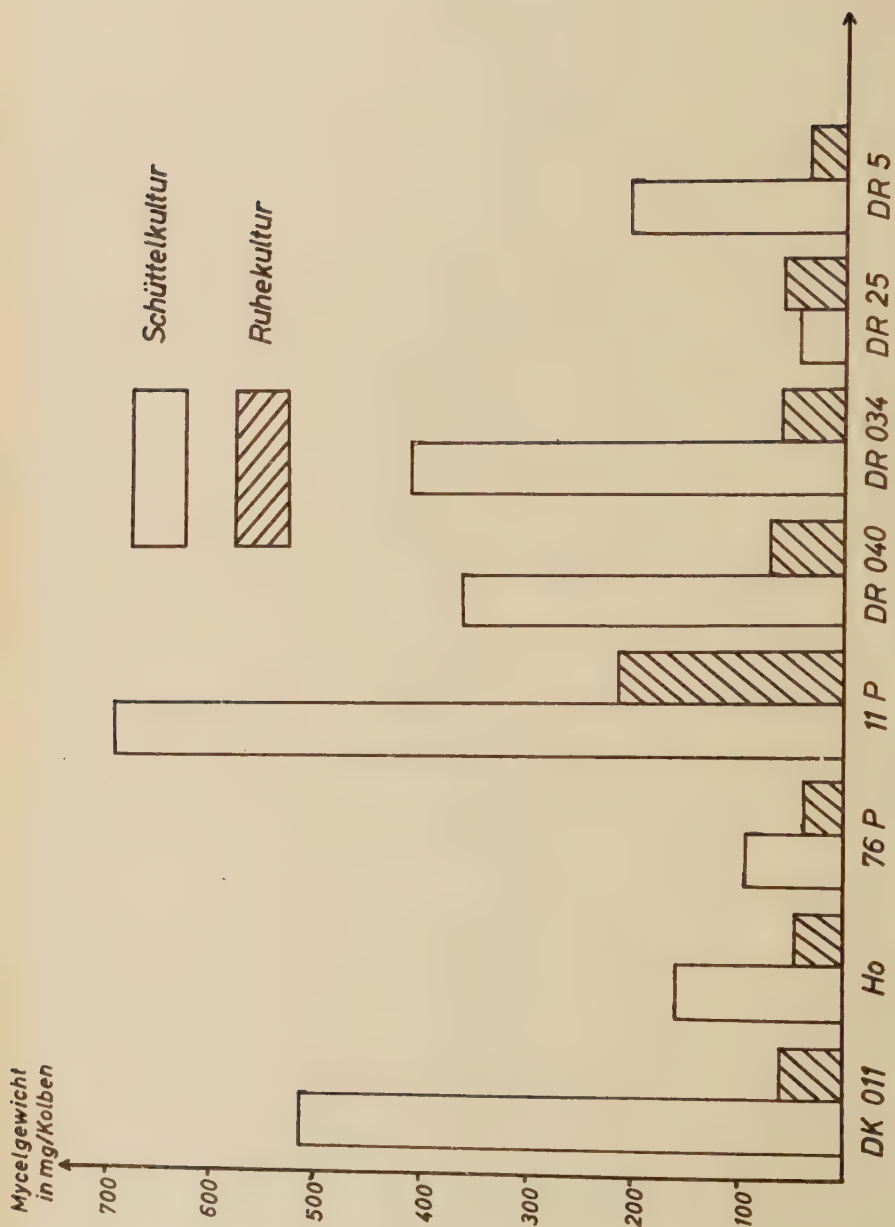
blick über die Wachstumsintensivierung als Folge der Schüttelbehandlung. Es läßt sich erkennen, daß jede Type verschieden auf die Schüttelbewegung reagiert. Bei der Type DK 011 beträgt die Steigerung etwa das siebenfache. Bei Ho, einer von Holcus mollis abstammenden Grasmutterkornkultur, steigerte sich das Erntegewicht auf das dreifache, ebenso bei der Type P 11. Die aus einem portugiesischen Mutterkorn wie P 11 gewonnene Kultur P 76 zeigte lediglich doppelte Intensität. Bei der Type DR 040 wurde eine fünffache, bei DR 034 eine sechsfache und bei DR 5 eine achtfache Steigerung des Mycelgewichtes festgestellt. Unbeeinflußt bleibt die Sorte DR 25, hier konnte durch die Schüttelbehandlung keine Gewichtsvermehrung beobachtet werden.

Während von den zuletzt erwähnten vier Abimpfungen der Type DR die ersten drei eine gewisse Ähnlichkeit in ihrem Verhalten zeigen, fällt DR 25 völlig aus dem Rahmen heraus. Diese Erscheinung ist interessant, weil alle vier Vertreter auf eine Type zurückgehen, welche über mehrere Jahre durch Selektionszucht herausgelesen worden war.

Tabelle VI:

Stamm:	Kulturdauer:	Durchschnittliches Trockenmycelgewicht	
		aus der Ruhekultur:	aus der Schüttelkultur:
DK 011	7 d	61 mg	519 mg
Ho	7 d	43 mg	156 mg
P 76	7 d	35 mg	79 mg
P 11	7 d	213 mg	686 mg
DR 040	7 d	64 mg	355 mg
DR 034	7 d	56 mg	404 mg
DR 25	7 d	54 mg	41 mg
DR 5	7 d	29 mg	198 mg

Betrachtet man die durch Schüttelbehandlung erzielten Ergebnisse und vergleicht sie mit den Resultaten anderer Autoren, so liegt der Schluß nahe, daß das unterschiedliche Ansprechen des



Graphische Darstellung zu Tabelle VI:

Durchschnittliches Trockenmycelgewicht pro Kolben aus Ruhe- und aus Schüttelkulturen.

Pilzes auf diese Behandlung eine rassische Eigenart ist. Nur mit dieser Einschränkung erscheint es angängig, von einer Beeinflussung des Wachstums durch Schüttelbehandlung im allgemeinen zu sprechen. Die Frage ob die erfolgreiche Schüttelbehandlung nur der Ausdruck einer besseren Sauerstoffversorgung, oder die Folge eines auf das Zellplasma ausgeübten mechanischen Reizes ist, kann noch nicht entschieden werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse stützen ferner die Vermutung, daß es sich bei einem Sklerotium und damit auch bei den hiervon abstammenden saprophytischen Kulturen meist nicht um einheitliche Rassen handelt. Vielfach werden es auch nach vorangegangener Selektionierung noch Populationen sein. Für vergleichende Versuche mußte daher mit erbgleichem Material gearbeitet werden, welches in Form von Klonen am einfachsten zu gewinnen ist.

A. Rippel-Baldes (32) erläutert ausführlich verschiedene Methoden, um zu solchen Einsporkulturen zu gelangen. Verdünnt man eine wässrige Aufschwemmung eines Mikroorganismus - in unserem Fall käme hierfür eine Sporensuspension in Betracht - soweit, daß in einem Volumen einer bestimmten Verdünnungsstufe noch ungefähr eine Spore vorhanden ist und impft eine Versuchsserie mit dem halben Volumen dieser Verdünnungsstufe, so wird man an der Zahl der mit Erfolg belegten Kulturgefäße feststellen können, daß sie etwa die Hälfte der Gesamtzahl beträgt. Mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit wird man dann behaupten können, daß die aus solchen Versuchsreihen gewonnenen Folgekulturen reinrassischen Ursprungs sind, wobei unter reinrassisch die ontogenetische Entwicklung, rückverfolgend bis zu einer einzelnen Spore zu verstehen ist. Der Methode haftet der Nachteil an, nicht mit absoluter Gewißheit reinrassische Folgekulturen zu liefern, ferner sind die arbeitstechnischen Maßnahmen zu umständlich. Günstiger ist die Anlage von Tröpfchenkulturen aus gewissen Verdünnungsstufen, wobei man sich durch mikroskopische Kontrolle überzeugen kann, ob pro Tropfen nur noch eine Zelle vorhanden ist. Aus solchen Tröpfchen-

kulturen, meist als Hängetropfen ausgebildet, lassen sich einzelne Sporen mit dem Mikromanipulator isolieren. Zur Reinzucht von Bakterien hat sich anderes Verfahren als vorteilhaft erwiesen. Eine gewöhnliche Flüssigkultur wird nach Verdünnung in noch flüssige, sterile Nährgelatine eingegossen und dort durch Schütteln gleichmäßig verteilt. Diese Anschüttelung wird unmittelbar darauf in Petrischalen ausgegossen. Überall dort, wo ein Keim im Nährmedium fixiert ist, wird Wachstum eintreten. Von diesen einzeln liegenden Kolonien ausgehend, kann man nun reinrassische Folgekulturen anlegen.

Diese Methoden sind zur Anlage von Einsporkulturen von *Claviceps* leider nicht geeignet, insbesondere letztere nicht, die im übrigen wegen ihres geringen apparativen Aufwandes besteht. Der Mutterkornpilz lebt aerob, das Auskeimen der Konidien innerhalb der Nährgelatine dürfte zumindest erschwert sein.

Ich wählte eine andere Arbeitsweise und isolierte einzelne Sporen nach einem im hiesigen Institut erprobten Verfahren (Abb. 31). Mit einiger Übung ist es damit möglich, täglich 50 bis 80 Klonkulturen anzulegen. Die sich entwickelnden Kulturen können identisch sein. Ob sie es sind stellt sich dann im Laufe ihrer Entwicklung heraus. Manchmal kann man bereits nach 3 bis 4 Tagen mit einer Lupe die ersten Mycelfäden erkennen. Verläuft das weitere Wachstum planmäßig, so beobachtet man nach etwa 8 bis 10 Tagen ein weißes, stecknadelkopfgroßes Gebilde, das sich kontinuierlich vergrößert und nach einigen Wochen auch durch Ab- und Überimpfung vermehrt werden kann.

Die vorstehend beschriebenen Versuche erbrachten einmal eine gewisse Vereinheitlichung technischer Details bei der Anlage saprophytischer Kulturen von *Claviceps purpurea*, zum anderen wurden auch gewisse Stoffwechselfragen geprüft und für die anzulegenden Kulturen bestimmte Nährstoffe erprobt. Damit war die Voraussetzung geschaffen in saprophytischen Kulturen die Alkaloiderzeugung durch den Pilz zu untersuchen.

Hier erstand als erste Aufgabe den qualitativen Alkaloidnachweis zu führen. Ich wählte die Reaktion nach H. W. van Urk (11), welche mir in ihrer Empfindlichkeit geeignet erschien. Sie hat zwar den Nachteil, daß offenbar nur bestimmte Alkaloide aus dem Mutterkorn eine Blaufärbung mit dem Reagenz geben. Die Einschränkung, daß ein positiver Ausfall der Reaktion nicht nur auf Mutterkornalkaloide hinweist, muß ebenfalls in Kauf genommen werden. Von Bedeutung für den Alkaloidnachweis ist ferner die Art der Extraktion des Pilzmycels. H. Kreitmair und W. Küssner (9) durchfeuchteten das abgeerntete und getrocknete Mycel mit Sodalösung und extrahierten mit Äther im Soxhlet-Apparat sechs Stunden. Die ätherische Lösung wurde mit 0,1 n-Salzsäure ausgeschüttelt und in dieser die Anwesenheit der Alkaloide bewiesen. R. Jaretsky (10), der den Pilz in weitlumigen Reagenzgläsern kultivierte, konnte den Pilzrasen nicht vom Substrat abtrennen; er hob daher Nährboden mit Mycel ab, zerrieb das ganze mit Sand zu einer homogenen Masse und unterwarf diese nach Trocknung der ammoniakalischen Ätherextraktion im Soxhlet-Apparat. G. Schweizer (13) extrahierte ebenfalls die Alkaloide aus dem Pilzmaterial mit ammoniakalischem Äther. Ähnlich wie R. Jaretsky arbeitet S. J. Ritzema (14) die saprophytische Droge auf. S. K. Sim und H. W. Youngken (19) extrahieren das auf saprophytischem Weg gewonnene und getrocknete Pilzmycel mit weinsaurem Äthanol. Auch L. Niedermayer (23) unterwirft die Droge nach Verreiben mit Seesand und getrocknetem Natriumsulfat der ammoniakalischen Ätherextraktion durch Schütteln. Die ätherische Lösung wird anschließend mit 1 %iger wässriger Weinsäure ausgeschüttelt

Bei meinen Versuchen kam ich zu folgender Arbeitstechnik. Nach dem Abernten der Mycelien wurden diese durch Abpressen zwischen Filtrierpapier von dem Großteil der Feuchtigkeit befreit und anschließend an der Luft getrocknet. Das Trocknen auf Horden bei Zimmertemperatur nahm durchweg nicht mehr als

zwei Tage in Anspruch. Das so getrocknete und anschließend gepulverte Mycel wurde mit weinsaurem Methanol perkoliert, nach dem Alkalisieren mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und das Lösungsmittel verdampft. Der Rückstand wurde mit Eisessig aufgenommen, mit wässriger Weinsäure verdünnt, filtriert und nach dem Versetzen mit dem Reagenz kolorimetrisch ausgewertet. Bei dieser Extraktions- und Reinigungsmethode werden außer Alkaloiden keine Stoffe miterfaßt, welche mit dem Alkaloidreagenz Farbreaktionen ergeben. Ferner fand ich nach Extraktion mit methanolischer Weinsäure stets die höchsten Blauwerte, was für eine vollständigere Extraktion spricht.

Zur Aufarbeitung des Kulturfiltrats wird zunächst der P_H -Wert festgestellt, und die Dichte bestimmt. Mit verdünntem Ammoniak wird schwach alkalisch gestellt, (P_H : 7,8 - 8,0), und anschließend mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Das Abdunsten des Lösungsmittels und das Aufnehmen des Rückstandes, sowie seine kolorimetrische Blauwertbestimmung erfolgt genau so, wie es bei der Aufarbeitung des Mycels beschrieben worden ist.

Im Verlauf meiner Untersuchungen war es von Bedeutung für mich, möglichst viele Stämme prüfen zu können, um solche herauszufinden, deren Auszug mit dem Reagenz nach van Urk positiv reagierte. Es mußte hierfür ein qualitativer Nachweis geschaffen werden, der in kurzer Zeit eine Aussage erlaubte, ob ein Mycel Wirkstoffe enthielt oder nicht. Hierzu wurde das noch feuchte Mycel alkalisiert und mit Methylenchlorid mazeriert. Der Rückstand aus dem Lösungsmittel wurde in Eisessig aufgenommen, mit wässriger Weinsäure verdünnt und direkt zur qualitativen kolorimetrischen Bestimmung verwandt.

Bei diesen "Schnelltesten" war infolge der direkten Extraktion des Pilzmaterials mit Methylenchlorid die Möglichkeit gegeben, Stoffe mitzuerfassen, die ebenfalls Färbungen mit dem Reagenz nach van Urk erzeugen und somit eine Anwesenheit spezifischer Mutterkornalkaloide vortäuschen.

Zur Abklärung dieser Möglichkeit wollte ich die Farbreaktionen des p-Dimethylaminobenzaldehyds in schwefelsaurer Lösung mit anderen Indolderivaten untersuchen, insbesondere solchen Verbindungen, deren Anwesenheit in saprophytischen Mutterkornkulturen möglich sein könnte.

Die Nährlösungen enthielten als Stickstoffquelle Pepton. Dieses Eiweißabbauprodukt enthält wechselnde Mengen Tryptophan, insbesondere nach tryptischer Verdauung. Neben Pepton mußte daher Tryptophan auf sein Verhalten unter den Bedingungen, unter denen die Mutterkornalkaloide nachgewiesen werden, geprüft werden. Ferner wurde die Indolyl-3-essigsäure (Heteroauxin) untersucht, die ebenfalls im Mutterkorn nachgewiesen sein soll (29). Nach den Angaben der Literatur soll das Heteroauxin mit dem Reagenz nach van Urk eine Blaufarbe erzeugen, deren Absorptionsmaximum bei ungefähr derselben Wellenlänge liegen soll, wie dasjenige der Blaufarbe, die von dem Reagenz und Mutterkornalkaloiden hervorgerufen wird.

Die Anwesenheit von Indolyl-3-essigsäure in Mutterkorn täusche daher bei den kolorimetrischen Bestimmungsmethoden der Alkaloide mit dem Reagenz nach H. W. van Urk einen zu hohen Gehalt vor.

Von zwei verschiedenen Peptonsorten (tryptisch verdautes Pepton aus Fleisch und tryptisch verdautes Pepton aus Casein), ferner von d,l-Tryptophan, von Indol, Indolyl-3-essigsäure, Indolyl-3-propionsäure, Tryptamin und Gramin wurde eine wässrige Stammlösung angesetzt, die 320 γ /ml der jeweiligen Verbindung enthielt. Diese Lösungen wurden mit Wasser im Verhältnis 1 + 1 verdünnt, die daraus resultierenden Lösungen entsprechend usw., bis zur niedrigsten Konzentrationsstufe von 20 γ /ml. Die so hergestellten fünf verschiedenen Konzentrationen jeder Verbindung wurden mit dem Alkaloidreagenz im Volumenverhältnis 1 + 2 versetzt und die entstehende Färbung beobachtet.

Tabelle VII:

Substanz:	Konzentration in g/ml:				
	320	160	80	40	20
Fleischpepton	-o-	-o-	-o-	-o-	-o-
Caseinpepton	-o-	-o-	-o-	-o-	-o-
d,l-Tryptophan	grünblau	grünblau	grünblau	graublau	graublau
Indol	braungelb	gelb	gelb	hellgelb	hellgelb
Indolyl-3-essigsäure	blau	blau	blau	violett-blau	violett
Indolyl-3-propionsäure	olivgrün	grün	grün	grün	grün
Tryptamin	grün	grün	grün	graugrün	graugrün
Gramin	hellblau	hellblau	violett	schwach violettstichig	

Die entstehenden Farben sind demnach stark von der Konzentration des zu prüfenden Stoffes abhängig. Damit mögen sich die Unterschiede zu den Färbungen, die E. Neuhoff (29) beobachtet hat, erklären lassen, weil dieser keine Konzentrationsangaben macht. Wie aus der Zusammenstellung ferner hervorgeht, zeigt lediglich die Indolyl-3-essigsäure eine ähnliche Blaufarbe, wie sie die Mutterkornalkaloide hervorbringen. In den niedrigen Konzentrationen ist der Farbton violettstichig. Gramin ein Indolderivat, das als Alkaloid in gewissen Gersten- und Schilfarten vorkommt, zeigt nur bei höherer Konzentration eine schwache Blaufärbung. Peptone reagieren in den angegebenen Konzentrationen nicht. Erst in 1 bis 2 %igen Lösungen entstehen stahlblaue, manchmal graublaue Farbtöne. Interessant war, die Extinktion der jeweiligen Blaufarbe von Heteroauxin und den beiden höchsten Graminkonzentrationen unter den Bedingungen zu messen, unter denen die Mutterkornalkaloide quantitativ bestimmt werden.

Tabelle VIII:

Konzentration der Verbindung in γ /ml:	Extinktion:	Entspricht einer Konzentration an Ergotaminbase in γ /ml:
Heteroauxin 320	1,080	mehr als 100
Heteroauxin 160	0,970	mehr als 100
Heteroauxin 80	0,750	96 (Faktor: 1,2)
Heteroauxin 40	0,500	63 (Faktor: 1,6)
Heteroauxin 20	0,262	34 (Faktor: 1,7)
Gramin 320	0,187	23 (Faktor: 0,07)
Gramin 160	0,146	18 (Faktor: 0,11)

Die durch Indolyl-3-essigsäure erzeugte Blaufarbe ist intensiver als die einer gleichen Gewichtsmenge Ergotamin. Eine Proportionalität im Verhältnis der Molekulargewichte liegt nicht vor. Damit ist fraglich, ob der Indolanteil im Molekül allein für das Zustandekommen der Farbreaktion verantwortlich zu machen ist.

S. Gordon und K. Nieva (30) diskutieren die Möglichkeit der Umwandlung von Tryptophan in Indolyl-3-essigsäure durch den lebenden pflanzlichen Organismus. Eine solche Entstehung von Heteroauxin wäre auch bei der saprophytischen Kultur von Clavicepsarten denkbar, da in dem als Stickstofflieferant verwendeten Pepton Tryptophan vorhanden ist.

Extrahiert man Mycelien, bei denen die Abwesenheit irgendwelcher mit dem Reagenz nach van Urk eine Blaufarbe erzeugender Stoffe festgestellt wurde, nach Zusatz von 1 % Heteroauxin ammoniakalisch mit Methylenchlorid direkt, so wie im "Schnelltest" beschrieben, so entsteht eine grüngraue Farbe, wenn man den nach Verdunsten des Lösungsmittels erhaltenen Rückstand mit dem Reagenz auf Alkaloide prüft. Im Falle der Extraktion mit methanolischer Weinsäure und anschließender alkalischer Ausschüttelung konnte im Rückstand nur eine ganz schwache, praktisch zu vernachlässigende Violettfröbung festgestellt werden.

Damit war nochmals erhärtet, daß die Blaufärbung mit dem Alkaloidreagenz nicht als spezifisch allein für Mutterkornalkaloide gelten kann. Von den störenden Substanzen kommt auf Grund der gleichen Farbreaktion nur die Indolylessigsäure in Frage. Ob diese jedoch in störenden Konzentrationen im Mutterkorn auftreten kann, erscheint fraglich. Für den "Schnelltest" ist somit der negative Ausfall der Reaktion nach van Urk eindeutiger als eine Blaufarbe. Im letzten Fall ist der Nachweis des Vorhandenseins von Alkaloiden noch auf andere Art zu führen.

Um die Frage der Alkaloidproduktion von *Claviceps purpurea* in saprophytischer Kultur zu prüfen, ging ich von der Arbeitshypothese aus, daß zum ersten genetische Voraussetzungen für eine solche Erscheinung gegeben sein müßten. Demnach mußte es gelingen, durch Abimpfung von wild gewachsenen Mutterkörnern unter den Folgekulturen saprophytischer Art solche mit Alkaloidproduktion zu erhalten. Über den Prozentsatz solcher positiven Kulturen bestand naturgemäß völlige Ungewißheit. Aber auch die im parasitischen Anbau gewonnenen Sklerotien mußten eine ähnliche Chance bieten. Waren doch in unserem Arbeitskreis schon mehrfach Beobachtungen gemacht worden, daß das im Rahmen der parasitischen Kultur zur Züchtung verwandte Prinzip der Selektion offenbar keine reinen Rassen ergab, sondern Typengemische resultierten (31).

War dann die Folgekultur eines Mutterkornes als Blaufärber erkannt worden, so war die nächste Aufgabe zu versuchen, durch die Anlage von Einsporkulturen ein genetisch einheitliches Pilzmaterial für Vergleichszwecke zu erhalten.

Von einer Mitarbeiterin unseres Arbeitskreises wurden im Sommer 1949 wildgewachsene Roggenmutterkörner im Raume Donaueschingen gesammelt. Nach den Einzelanalysen wies das Sklerotium No. 50 den höchsten Alkaloidgehalt auf (0,632 % nach der Weinsäuremethode). Von diesem wurden Schrägagarkulturen angelegt und 1950 auf einer Versuchsparzelle die Type parasitisch angebaut. Von der hieraus resultierenden Ernte wurden wiederum

Sklerotien einzeln analysiert. Das Sklerotium No. 11 besaß einen Gehalt von 0,444 % an Gesamtalkaloiden, berechnet als Ergotamin. Die von diesem Mutterkorn angelegte Schrägagar-kultur ergab in der Folgekultur eine verhältnismäßig kräftige Blaufärbung im Alkaloidtest. Sie bildete die erste Stammkultur für meine Versuche zur Prüfung der Alkaloidbildung unter der Bezeichnung DK 011. Nach der bereits beschriebenen Methode wurden davon Einsporkulturen angelegt, die als Klonkulturen K 90 bis K 93 zunächst auf Dextrose-Pepton-Agar in Reagenzgläsern vermehrt und von hier aus auf flüssigem Substrat angelegt wurden. Das äußere Erscheinungsbild dieser 4 Einsporkulturen, isoliert aus der Stammkultur DK 011, war so uneinheitlich und verschieden, daß es im folgenden durch einige Abbildungen belegt werden soll. Diese zeigen immer 4 Kulturgefäße eines Klones im Altersunterschied von 2 Wochen. Bereits nach 2 Wochen (Abb. 32 - 35), einer für Ruhekulturen verhältnismäßig kurzen Zeitspanne, ist der überlegene Wuchs von K 90 gegenüber seinen "Geschwistern" offensichtlich. Während diese erst im Anfangsstadium der Oberflächenmycelbildung sind - K 93 ist sogar noch völlig submers - zeigt K 90 üppigen Wuchs. Nach weiteren 2 Wochen war das gesamte Erscheinungsbild etwas ausgeglichener und gleichmäßiger. Jetzt zeigte jede Versuchsreihe kräftiges Mycel, jedoch war nur bei K 90 beginnende violette Verfärbung eingetreten (Abb. 36). Die Abb. 37 und 38 zeigen K 91 bzw. K 92. Hier fehlt trotz guter Mycelentwicklung noch die Pigmentbildung. K 93 bleibt nach wie vor hinter allen anderen Klonen in der Entwicklung zurück. Sein Oberflächenmycel könnte nach der morphologischen Systematik von H. Kirchhoff (7) als Gekröseform bezeichnet werden.

Nach insgesamt 6 Wochen saprophytischer Vegetationsperiode wurden alle Reihen abgeerntet. Aus den Abb. 40 - 43 ist ersichtlich, daß äußerlich keine weiteren wesentlichen Veränderungen mehr eingetreten sind, wenn man davon absieht, daß nunmehr auch K 92 einige violette Mycelstellen aufweist, deren Farbinsintensität mit dem von K 90 gebildeten violetten Mycel jedoch keinen Vergleich aushält.

Da die Folgekultur aus der Stammkultur DK Oll im Kleinversuch eine recht starke Blaufärbung im Alkaloidtest ergeben hatte, wurde ein größerer Versuch angelegt, um aus entsprechenden Mycelmengen, die mit dem Alkaloidreagenz eine Blaufärbung erzeugende Substanz isolieren zu können. Hierzu wurden 200 Erlenmeyerkolben (1000 ml) mit je 200 ml Dextrose-Peptonlösung beschickt und mit der Stammkultur DK Oll belegt. Der Versuch wurde am 8. 10. 1952 begonnen und am 26. 11. 1952 abgeerntet. Die einzelnen Kulturen zeigten ein unterschiedliches Aussehen. Um zu prüfen, ob das abweichende Erscheinungsbild einzelner Kulturgefäße sich auch im Alkaloidgehalt ausdrückt, analysierte ich drei der unterschiedlichsten Kolben. Nummer I war ein Vertreter derjenigen, die am Ende der Kulturperiode als mäßig gewachsen einzustufen waren. Das Mycel war dürrtig entwickelt und nur wenig oder gar nicht violett gefärbt. Kolben Nummer II entsprach der Hauptmenge aller Kulturgefäße, war also ein ausgesprochener Durchschnittskolben. Er zeigte kräftiges, deutlich violett gefärbtes Mycel. Kolben Nummer III wies extrem blau violett und üppig entwickeltes Mycel auf. In diesem Zusammenhang möchte ich darauf hinweisen, daß sowohl bei der Type DK Oll als auch bei der Klonkultur K 9 die violette Pigmentierung des Mycels immer dann aufgetreten war, wenn später bei der Aufarbeitung des Kulturfiltrates und des Mycels sich beide als alkaloidhaltig erwiesen. Es bestand sogar eine direkte Proportionalität zwischen Violett-färbung und Alkaloidgehalt: Je intensiver die Farbstoffbildung, umso höher der Alkaloidgehalt. Somit konnte die Verfärbung des Mycels für diese zwei Typen als äußeres Merkmal einer stattgehabten Alkaloidproduktion herangezogen werden. Bei ungefärbten, weißlichen oder graubraunen Mycelien waren niemals Alkaloide gefunden worden. In den nachfolgenden Beschreibungen der weiteren Großkulturversuche sind dann solche Erscheinungsformen stets mit dem Prädikat "unbrauchbar" belegt, wobei unter dieser Bezeichnung ein nur geringer Alkaloidgehalt bzw. die Abwesenheit von Alkaloiden zu verstehen ist. Die Aufarbeitung solcher Kulturen übertrug sich. Alle Kulturgefäße, welche gefärbte Mycelien und damit auch Alkaloide enthielten, wurden als brauchbar bezeichnet.

Tabelle IX:

Nummer des Kolbens:	End-P _H :	Alkaloidgehalt in der Nährlösung: im Mycel:		Fettgehalt im Trockenmycel:
I	5,7	0,44 mg%	0,018 %	26,4 %
II	5,6	1,50 mg%	0,052 %	13,1 %
III	5,4	2,50 mg%	0,079 %	9,9 %

Kolben No. III hatte mit 2,5 mg% Blauwert in der Nährlösung einen Gehalt, wie ich ihn mit der Type DK Oll zu keinem späteren Zeitpunkt mehr erreichen konnte. Auffallend ist ferner die umgekehrte Proportionalität zwischen Fett- und Alkaloidgehalt im Trockenmycel.

Nach der Voruntersuchung wurden die restlichen 197 Kolben in ihrer Masse vereinigt und durch Filtration in Nährlösung und Mycel getrennt. Die Nährlösung enthielt 1,46 mg% Alkaloide und das gut vermischte Trockenmycel hatte einen Blauwert, der 0,061 % Alkaloid entsprach. Beide Werte kommen denen, die im Kolben Nummer II, dem Durchschnittskolben ermittelt worden waren, recht nahe. Die Aufarbeitung der gesamten Nährlösung und die Extraktion des Trockenmycels nach der im experimentellen Teil beschriebenen Arbeitsweise ergab ein Rohalkaloidgemisch, welches in der Hauptsache bei der Ausarbeitung von Isolierungs- und Reinigungsmethoden verbraucht wurde. Aus dem Kulturfiltrat hätte auf Grund des Gehaltes von 1,46 mg% mit einer Ausbeute von etwa 400 mg Alkaloid gerechnet werden können. Wenn ich nur 90 mg an Rohalkaloid gewinnen konnte, so führe ich diese unvollständige Ausbeute auf das nur einmal erfolgte Ausschütteln zurück, in zweiter Linie auf die mangelnde Erfahrung bei der Aufarbeitung erheblicher Mengen an Nährlösung, welche anfangs ziemliche Schwierigkeiten bereitete.

Da weitere Untersuchungen zur Festlegung einer Aufarbeitungstechnik für das Wirkstoffgemisch erwünscht waren, wurden von der gleichen Stammkultur DK Oll neue Serien von Flüssigkulturen angelegt. Sie zeigten bei der Aufarbeitung jedoch ausnahmslos keine Blaufärbung im Alkaloidtest. Dieses auffällige Ergebnis

führte zu einer Überprüfung der Versuchsbedingungen, um eventuell die Ursachen des veränderten physiologischen Verhaltens der Type DK Oll aufzufinden.

Als einziger Unterschied in der Anlage der Nährböden war zu bemerken, daß in den neuen Serien ein anderes Pepton Verwendung gefunden hatte. Während im ersten Großversuch "Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut", geliefert von der Firma A, der Kulturflüssigkeit zugesetzt worden war, hatte ich bei den sich anschließenden Versuchen "tryptisch verdautes Pepton aus Casein" eingesetzt. Es mußte daher zunächst die Frage geklärt werden, ob nur bestimmte Peptonsorten die Pilztype DK Oll in saprophytischer Kultur zur Alkaloidproduktion veranlassen.

Von verschiedenen Firmen, die Peptone zu bakteriologischen Zwecken in den Handel bringen, wurden nun Proben auf ihre Eignung untersucht. Ferner erhielt ich Muster zweier Chargen, welche die Lieferfirma A zu dieser Zeit zur Verfügung hatte. Die von mir untersuchten Peptonsorten unterschieden sich hinsichtlich ihres Schüttvolumens, ihrer Dichten, hatten verschiedene Farbtöne sowie abweichende Geruchsnuancen. Aus der nachfolgenden Tabelle X wird ersichtlich, wie die Type DK Oll mit verschiedenen Peptonen als Stickstoffquelle unterschiedliches Wachstum zeigte, welches sich letztlich im Myceltrockengewicht widerspiegelt. Besonders auffällig erscheint die Tatsache, daß die Type DK Oll nur mit einer unter verschiedenen Chargen der Qualität "Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut" der Lieferfirma A Alkaloide produziert. Es handelte sich dabei um die Charge 216 687, die gleiche Charge, mit der der erste erfolgreiche Großversuch beschickt worden war.

In der Tabelle X sind nur ein Teil der im Rahmen der Arbeit untersuchten Peptonsorten aufgeführt. Alle anderen zu einem späteren Zeitpunkt geprüften Peptone ergaben in Bezug auf die Alkaloidbildung negative Ergebnisse. Da jeder Versuch völlig gleichmäßig beimpft worden war, muß auch das unterschiedliche Myceltrockengewicht auf die Eignung des betreffenden Peptons zurückgeführt werden.

Tabelle X:

Peptonsorte:	Maximales Trockenmycel- gewicht pro Kolben:	Kulturdauer:	Alkaloidnachweis:
A	4,75 g	50 d	positiv
B	4,8 g	56 d	negativ
C	3,8 g	56 d	negativ
D	3,0 g	49 d	negativ
E	4,1 g	35 d	negativ
F	3,4 g	49 d	negativ

Damit lag die Annahme nahe, daß der Stamm DK 011 zur Biosynthese von Wirkstoff in saprophytischer Kultur nicht nur "tryptisch verdautes Pepton aus Fleisch" beansprucht, sondern dieses mußte wiederum von einer ganz bestimmten optimalen Zusammensetzung sein, wie sie nur einmal zufällig in der fraglichen Charge 216 687 vorgelegen hatte.

Von den aus der Type DK 011 isolierten und weitergezüchteten Klonkulturen K 90 bis K 93 erwiesen sich mit dem gleichen Pepton als nicht Alkaloid erzeugend "K 91" und "K 93", während "K 92" schwach positiv war. Allein "K 90" zeigte im Extrakt seines Mycels starke Blaufärbung mit dem Reagenz nach van Urk. Im Trockenmycel lag der Wirkstoffgehalt mit 0,1 % in der ähnlichen Größenordnung, wie sie bei DK 011 ermittelt worden war. Um diese Menge an Wirkstoff zu erzeugen, benötigt K 90 in geeigneten Kulturgefäßen etwa 4 Wochen. Eine kurze Wachstumsperiode ist nicht nur bestimmten Pilztypen eigen, sondern ist auch durch die Größe der verwendeten Kulturgefäße zu beeinflussen. Für K 90 stellte sich in weiteren Versuchen heraus, daß Erlenmeyerkolben zu 300 ml, beschickt mit 90 bis 100 ml Nährlösung, oder solche mit dem Fassungsvermögen von 200 ml mit 50 bis 60 ml Nährflüssigkeit gefüllt, ein Optimum darstellen.

Weitere Untersuchungen mit den Typen DK 011 und K 90 erschienen solange aussichtslos, als es nicht gelang für die inzwischen aufgebrauchte, zur Alkaloidproduktion geeignete Charge 216 687 entsprechenden Ersatz zu finden. Zwischenzeitlich versuchte ich, nicht brauchbare Peptone durch Zusatz verschiedener Stickstoffverbindungen "geeignet" zu machen, da vielleicht Mangel an einer bestimmten Aminosäure den Prozeß der Alkaloidbildung unterbrochen haben könnte.

Der Zusatz von Aminosäuren zu Nährböden wird in der Literatur mehrfach erwähnt. Nach R. Jaretsky (10) kann Asparagin allein die Aufgabe einer Stickstoffquelle erfüllen. S. K. Sim und H. W. Youngken (19) stellten experimentell fest, daß Indol den Wuchs von *Claviceps purpurea* in saprophytischer Kultur stark hemmt, desgleichen Tryptophan, jedoch nicht so ausgeprägt wie erstgenannte Verbindung. Tryptophan zeige ferner eine Stimulierung der Alkaloidproduktion. Nach neueren Untersuchungen von V. E. Tyler und A. E. Schwarting (21) ist der Pilz in saprophytischer Kultur befähigt, aus zugesetztem Indol, Tryptophan zu bilden. Die nächste denkbare Stufe im Prozeß der Alkaloidbildung, die Lysergsäure, konnte jedoch nicht von ihnen aufgefunden werden.

Tabelle XI:

Stamm:	Kolben- zahl:	Wuchsperiode:	Zusatz zur Dextrose- Pepton- lösung:	Konzen- tration:	Alkaloid- nachweis:
DK 011	2	9.1.-13.2.53	Asparagin	0,005 mol	negativ
DK 011	2	9.1.-13.2.53	Histidin	0,005 mol	negativ
DK 011	2	9.1.-13.2.53	Tryptophan	0,005 mol	negativ
DK 011	2	9.1.-13.2.53	Indol	0,005 mol	negativ
DK 011	2	14.1.-13.2.53	Alanin	0,005 mol	negativ
DK 011	2	14.1.-13.2.53	Glykokoll	0,005 mol	negativ
DK 011	2	14.1.-13.2.53	Tyrosin	0,005 mol	negativ
DK 011	2	14.1.-13.2.53	Ammon. Succinat	0,7 %	negativ
DK 011	2	14.1.-13.2.53	Kalium- nitrat	0,1 %	negativ

Wie aus der Zusammenstellung hervorgeht, war keine der eingesetzten Substanzen in der Lage, die Type DK 011 zur Alkaloidproduktion zu veranlassen. Eine schwache Wachsförderung war in den mit Asparagin und Tryptophan zusätzlich versorgten Kulturen zu beobachten. Einwandfrei gehemmt war das Wachstum bei den Kulturen, die Histidin, Indol und Tyrosin enthielten. Alle anderen Zusätze hatten keinen erkennbaren Einfluß. In keiner der Kulturgefäße konnte nach 4 Wochen Wachstum die geringste Violettfärbung, ein Zeichen für Alkaloidsynthese durch den Pilzorganismus, beobachtet werden. Mit negativem Ergebnis wurde der Versuch abgebrochen.

Im Mai 1953 erhielten wir von der Lieferfirma A eine Probe einer neuen Charge von "tryptisch verdaulichem Fleischpepton" (Chargennummer: 38 073), dessen Prüfung auf Eignung ein interessantes Ergebnis hatte. Während die mit ihm angesetzten Kulturen der Type DK 011 keine Alkaloidbildung zeigten, erwies sich der Tochterklon K 90 in gleicher Weise angesetzt als positiv.

Tabelle XII:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchsperiode:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung; im Mycel:	
DK 011	5	7.5.-2.7.53	-o-	-o-
K 90	3	2.6.-7.7.53	3,0 mg%	0,09 %

Nachdem sich die neue Charge Pepton als geeignet für die saprophytische Züchtung von K 90 erwiesen hatte, wurden Versuche mit der Type DK 011 nicht mehr unternommen. Die weitere ausschließliche Verwendung der Klonkultur K 90 für Versuche um die Alkaloidproduktion erschien ferner aus dem Grund der Verwendung genetisch einheitlichen Pilzmaterials als vorteilhaft.

Am 19. Juni 1953 wurde daher ein neuer Großversuch von 290 Kolben mit K 90 angelegt. Als Nährlösung wurde Dextrose-Peptonlösung eingesetzt unter Verwendung der neuen Pepton-

charge 38 073, die sich im Vorversuch für K 90 als geeignet erwiesen hatte. Der Versuch mit der Bezeichnung "V 125" wurde am 25. August 1953 abgeerntet, nachdem vorher in gleichmäßigen Abständen immer ein Kolben abgeerntet wurde, der auf seinen Zucker- und Alkaloidgehalt untersucht wurde, um einen Einblick in den partiellen Stoffwechsel zu erhalten und besser den günstigen Erntetermin ermitteln zu können. Wie aus der Tabelle XIII zu entnehmen ist, war die Kohlenstoffquelle nach Ablauf von 45 Tagen erschöpft, und der Organismus begann jetzt Alkaloide zu erzeugen. Die Produktion war jedoch insgesamt so gering, daß nach Trocknen des Mycels in einer Probeextraktion, die zur Ermittlung des Durchschnittsgehaltes angestellt wurde, nur noch Spuren festgestellt werden konnten, so daß von einer präparativen Aufarbeitung abgesehen wurde.

Tabelle XIII:

Stamm:	Kolben- nummer:	Alter:	Dichte der Nähr- lösung:	Dextrose- gehalt pro Kolben: Anfangswert = 10 %	Alkaloidgehalt in	
					Nähr- lösung:	im Mycel:
K 90	1	20 d	1,039	8,5 %	-o-	-o-
K 90	2	25 d	1,031	6,5 %	-o-	-o-
K 90	3	30 d	1,030	6,2 %	-o-	-o-
K 90	4	37 d	1,026	4,8 %	-o-	-o-
K 90	5	40 d	1,019	2,7 %	(+)	-o-
K 90	6	45 d	1,004	Spuren	0,68 mg%	0,03 %
K 90	7	50 d	1,003	Spuren	0,47 mg%	0,013 %
K 90	8	55 d	1,001	-o-	0,67 mg%	0,023 %
K 90	gesamter Groß- versuch	66 d	1,004	-o-	0,50 mg%	(+)

Ich habe dann versucht, durch die Gabe von Zusatzstoffen die Klonkultur zur Alkaloidproduktion zu bringen.

Tabelle XIV:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchs- periode:	Zusatz zu der Dextrose- Pepton- lösung:	Konzentration:	Alkaloidgehalt	
					Nähr- lösung	Mycel:
K 90	2	17.7. - 7.9.53	Vitamin C	0,025 %	+	+
K 90	2	17.7. - 7.9.53	Vitamin C	0,05 %	0,7 mg%	0,1 %
K 90	2	17.7. - 7.9.53	Vitamin C	0,1 %	1,2 mg%	0,05 %
K 90	2	21.7. - 11.9.53	Indol- essig- säure	10 ⁻⁶ mol	+	+
K 90	2	21.7. - 11.9.53	Indol- essig- säure	10 ⁻⁵ mol	(+)	+
K 90	2	21.7. - 11.9.53	Indol- essig- säure	10 ⁻⁴ mol	(+)	+
K 90	2	21.7. - 14.9.53	Indol- propion- säure	10 ⁻⁶ mol	(+)	-o-
K 90	2	21.7. - 14.9.53	Indol- propion- säure	10 ⁻⁵ mol	+	+
K 90	2	21.7. - 14.9.53	Indol- propion- säure	10 ⁻⁴ mol	1,05 mg%	0,02 %
K 90	2	21.7. - 14.9.53	Litrison	1 Dragée	1,39 mg%	0,05 %
K 90	2	21.7. - 14.9.53	Litrison	2 Dragées	+	+
K 90	2	22.7. - 14.9.53	Ovibion	1 ml	(+)	-o-
K 90	2	22.7. - 14.9.53	Ovibion	2 ml	-o-	+
K 90	2	22.7. - 14.9.53	Ovibion	4 ml	-o-	+
K 90	2	22.7. - 14.9.53	Orchibion	1 ml	(+)	+
K 90	2	22.7. - 14.9.53	Orchibion	2 ml	-o-	+
K 90	2	22.7. - 14.9.53	Orchibion	4 ml	-o-	-o-

Bereits H. D. Michener und N. Snell (16) prüften eine ganze Reihe von Vitaminen, sowie Verbindungen wie Cholin, Xanthin, Adenin, Guanin, Uracil, ferner Heteroauxin auf ihre wuchsstimulierende Wirkung, ohne Erfolge sehen zu können. L. Niedermayer (23) setzt seinen Kulturen Vitamine zu, sowohl die wasser- als auch lipoidlöslichen, ferner Wuchsstoffe wie Inosit und p-Aminobenzoesäure. Auch er kann keine Wuchsförderung konstatieren. E. Baldacci (15) gibt zu seinen Kulturen Indolylpropionsäure, eine nicht näher bezeichnete Liquido "Roche" und Naphthylessigsäure, ferner die Vitamine B₁ und C. Erfolge waren keine zu sehen.

So wurden auch von mir, wie die vorstehende Tabelle XIV (siehe Seite 45) zeigt, Vitamin C in verschiedenen Konzentrationen der Vitamin-B-Komplex, ferner Testis- und Ovarialtotal-extrakte den saprophytischen Kulturen von K 90 zugefügt, ohne daß es zu einer merklichen Beeinflussung des Wuchses oder der Alkaloidproduktion gekommen wäre. Ebenso zeigten Heteroauxin und Indolylpropionsäure keine Wirkung.

Obwohl ich beim Zusatz von Aminosäuren zu den Kulturen der Type DK 011 keinen Erfolg hatte, versuchte ich dasselbe bei den Kulturen von K 90. Überraschenderweise brachte die Verwendung von Asparagin und Tryptophan als Zusatzstoffe hierbei einen beachtlichen Erfolg.

Tabelle XV:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchsperiode:	Zusatz:	Konzentration:	Alkaloidgehalt	
					Nähr- lösung:	Mycel
K 90	3	2.6.-7.7.53	ohne	-	3,0 mg%	0,10
K 90	3	2.6.-7.7.53	Asparagin	0,01 mol	3,15 mg%	0,13
K 90	3	2.6.-7.7.53	Asparagin	0,05 mol	4,3 mg%	0,16
K 90	3	2.6.-7.7.53	Asparagin	0,1 mol	3,8 mg%	0,19
K 90	3	2.6.-7.7.53	Tryptophan	0,01 mol	6,3 mg%	0,20
K 90	3	2.6.-7.7.53	Tryptophan	0,05 mol	-o-	-o-
K 90	3	2.6.-7.7.53	Tryptophan	0,1 mol	-o-	-o-

In diesen Versuchen haben die Aminosäuren Asparagin und Tryptophan offensichtlich die Alkaloidproduktion zu steigern vermocht. Ganz überraschend hat aber auch die Kontrollreihe einen beachtlichen Alkaloidgehalt aufzuweisen. Diese Tatsache ist umso auffälliger, als die gleiche Pilztype in dem zur selben Zeit laufenden Großversuch V 125 praktisch kaum Alkaloidproduktion aufwies.

Auf Grund des beobachteten Einflusses von Asparagin und Tryptophan im Sinne einer positiven Beeinflussung der Alkaloidsynthese durch K 90 bei der Züchtung "in vitro" wurde am 14. Juli 1953 ein neuer Großversuch mit der Bezeichnung "V 141-142" in 420 Kolben angelegt. Als Grundnährlösung diente wiederum die bewährte Dextrose-Peptonlösung, zugesetzt wurde außerdem 0,75 % l(-)Asparagin. Als Kontrollreihe dienten 70 Kulturgefäße, welche diesen Zusatz nicht enthielten. Beim Abernten zeigte sich, daß diese Kontrollreihe wie der vorausgegangene Großversuch V 125 völlig unbrauchbar war. Aus dem Hauptversuch konnten lediglich etwa 80 Kolben mit dem Prädikat "brauchbar" versehen werden. Ihr Mycel wurde weiter verarbeitet und es gelang, hieraus 107 mg eines Rohalkaloidgemisches zu gewinnen.

Unter der Bezeichnung "V 180-183" wurde am 3. September 1953 ein neuer Großversuch angelegt. 200 Kulturgefäße wurden mit Dextrose-Peptonlösung beschickt und mit K 90 beimpft. Als Zusatz wurde dem Substrat 0,2 % d,l-Tryptophan beigegeben, eine Konzentration, die in den Vorversuchen als optimal erkannt worden war. (Vgl. auch Tab. XV). Dieser Versuch zeigte zu Beginn erfreuliches Wachstum, was Schnelligkeit und Intensität anbetraf. Bereits nach 2 Wochen wiesen eine Reihe der Kolben Oberflächenmycel mit beginnender Violettfärbung auf. Im Verlauf der Kulturperiode ließ die Wuchsentensität nach. Nach über 6 Wochen zeigte sich, daß nur etwa die Hälfte aller Kulturen als brauchbar zur weiteren Verarbeitung angesehen werden konnten, jedoch entsprach dieser Prozentsatz keineswegs den Erwartungen, die in den Zusatz von d,l-Tryptophan nach den Vorver-

suchen gesetzt werden konnten. Die abfiltrierte Nährlösung wies einen Alkaloidgehalt von 0,89 mg% auf. Aus dem Feuchtmycel wurden ca. 40 mg Rohalkaloidgemisch gewonnen, das sich an der Aluminiumoxydsäule in zwei verschiedene Fraktionen zerlegen ließ.

Nach diesem Großversuch konnte man den Eindruck gewinnen, als ob die Vitalität und gleichzeitig die Potenz von K 90, in saprophytischer Kultur Alkaloide zu erzeugen, geringer geworden sei. In diesem Fall war es naheliegend, die einmal erfolgreiche Wirkung von Asparagin und Tryptophan im Kleinversuch im Sinne eines nur einmal gewirkt habenden Reizes zu deuten, wofür die fehlgeschlagenen, zumindest weit in der Erwartung zurückgebliebenen Großversuche sprechen, könnten.

In der Zwischenzeit und im Anschluß an die beschriebenen Versuche wurde weiter nach Reizen gefahndet und in diesem Zusammenhang die Möglichkeit geprüft, durch die Verwendung von Schwermetallen zum Erfolg zu kommen.

Der Einfluß geringer Mengen an Schwermetallionen auf das Wachstum und die Verhinderung gewisser Krankheits- und Ausfallerscheinungen bei höheren Pflanzen ist bekannt. Bei den Gramineen, speziell bei Hafer und Gerste, kennt man den fördernden Einfluß von Bor, Mangan, Kupfer, Eisen und Zink, wie K. Scharrer (33) beschreibt. D. F. Boas (34) erwähnt, daß Zink, Kupfer und Mangan bei Pilzen eine Rolle spielen. Da die Gräser die natürlichen Wirtspflanzen für den Mutterkornpilz sind, ist es denkbar, daß für deren Wachstum fördernd wirkende Spurenelemente auch auf den Wuchs von *Claviceps purpurea* "in vitro" positiv wirken.

H. D. Michener und N. Snell (16) fügten ihren Kulturen Eisen, Zink, Kupfer und Mangan zu. V. E. Tyler und A. E. Schwarting (20) benutzten die Spurenelementlösung nach G. Beadle und E. Tatum (35), welche von ersteren als Grundnährlösung bezeichnet wird, da sie neben anorganisch gebundenem Stickstoff in Form von Ammoniumnitrat auch die unbedingt notwendigen Salze wie primäres Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat enthält. Als

Spurenelemente im eigentlichen Sinne enthält diese Lösung Calcium, Eisen, Bor, Kupfer, Mangan, Zink und Molybdän.

L. Niedermaier (23) prüfte die Wirkung der A bis Z Lösungen nach D. R. Hoagland (36). In hohen Konzentrationen sah er Wachstumshemmung und sonst keinen Einfluß.

Durch Mineralisierung von Sklerotien der Type DK 011 verschaffte ich mir einen Einblick in die Zusammensetzung der in der Droge vorkommenden anorganischen Elemente. In Anlehnung an das Ergebnis wurde eine Lösung der entsprechenden Salze hergestellt (Spurenelementlösung II im experimentellen Teil), die den jeweiligen Nährlösungen zugesetzt wurde. Der Einfluß dieser Zusätze ist aus der Tabelle XVI zu entnehmen.

Tabelle XVI:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchs- periode:	Pepton- charge:	Spuren- elemente:	Alkaloidnachweis Nähr- lösung:	Mycel:
K 90	5	12.6. - 23.7.53	216 687	keine	3,1 mg%	0,11 %
K 90	5	24.6. - 25.7.53	216 687	Lösung II	-o-	-o-
K 90	5	12.6. - 23.7.53	38 073	keine	1,06 mg%	0,04 %
K 90	5	12.6. - 23.7.53	38 073	Lösung II	-o-	-o-

Auffällig war die Reaktion des Klones K 90 auf den Spurenelementzusatz. In den Kontrollreihen, ohne Schwermetalle, zeigte sich der Pilz als Blaufärber, wobei zu bemerken ist, daß er mit der alten Peptoncharge 216 687 (tryptisch verdautes Pepton aus Fleisch) mit der sich allein die Type DK 011 als alkaloiderzeugend erwiesen hatte, besser arbeitet, als mit der neuen Charge 38 073, ebenfalls tryptisch verdautes Fleischpepton, was jedoch nach Tabelle XII für die Type DK 011 überhaupt nicht geeignet war. In keinem Falle konnten in den Zuchtversuchen mit Spurenelementzusatz Alkaloide nachgewiesen werden. Die Schwermetallionen scheinen demnach auf die Biosynthese von Alkaloiden

in saprophytischer Kultur hemmend zu wirken, wenn im Kulturfiltrat als Stickstofflieferant Pepton vorliegt. Daß grundsätzlich auch bei Anwesenheit von Schwermetallen Alkaloide gebildet werden können, beweist folgender Versuch, bei dem die 2 % Pepton in der Nährlösung durch 1 % Asparagin ersetzt wurden.

Tabelle XVII:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchs- periode:	Nähr- substrat:	Spuren- elemente:	Alkaloidnachweis	
					Nähr- lösung:	Mycel:
K 90	12	1.7. - 28.8.53	10 % Dextrose + 1 % Asparagin	keine	3,0 mg%	0,08 %
K 90	12	1.7. - 28.8.53	10 % Dextrose + 1 % Asparagin	Lösung II	0,8 mg%	0,05 %

Ebenso zeigt der Versuch, daß eine Alkaloidsynthese "in vitro" auch ohne geeignetes Pepton, allein nur mit einer Aminosäure möglich ist. Asparagin leistet jedoch nicht ganz dasselbe, wie geeignetes Pepton (siehe Tabellen XV und XVI).

Auch die Spurenelementlösung nach G. Beadle und E. Tatum (35) hatte ich bereits früher auf ihre Eignung untersucht. Es zeigte sich, daß auch diese Schwermetallkomposition die Alkaloidproduktion der Type DK Oll in saprophytischer Kultur erheblich reduzierte.

Tabelle XVIII:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchs- periode:	Nähr- substrat:	Zusätze:	Alkaloidgehalt	
					Nähr- lösung:	Mycel:
DK 011	5	29.1. - 4.3.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton (Charge: 216 687)	keine	0,68 mg%	0,059 %
DK 011	5	29.1. - 4.3.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton (Charge: 216 687)	0,05 % Vitamin C	0,24 mg%	0,018 %
DK 011	5	29.1. - 4.3.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton (Charge: 216 687)	0,05 % Vitamin C + Spuren- element- lösung I	(+)	-o-

Nachdem die Großversuche mit Zusätzen von Asparagin und Tryptophan (V 141-142 und V 180-183) nicht recht ermutigend verlaufen waren, wurde einige Zeit später dieses Experiment im kleinen wiederholt, zusätzlich wurde aber jetzt noch der Faktor Schwermetalle in die Kombination mit einbezogen, wobei diesmal die im experimentellen Teil beschriebene "Lösung III" eingesetzt wurde, die sich in der Zusammenstellung an die von H. D. Michener und N. Snell erprobte Spurenelementlösung anlehnt (16). Die bereits beim ersten Versuch im Juni 1953 als ungünstig wegen der zu hohen Konzentration erkannten Zusätze von 1 % und 2 % Tryptophan wurden nicht mehr geprüft, dagegen versuchte ich die damals als optimal gefundene Konzentration von 0,2 % Tryptophan durch zwei weitere Versuche mit je 0,1 % und 0,5 % Zusatz an dieser Aminosäure sozusagen "einzugabeln", um die Bestätigung für die Annahme, daß ein 0,2 %iger Zusatz von Tryptophan das Optimum für diese Pilztype darstellt zu erhalten.

Tabelle XIX:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchs- periode:	Zusätze zur Dextrose- Pepton- lösung:	Konzentration:	Alkaloidgehalt	
					Nähr- lösung:	Mycel:
K 90	5	16.10. - 30.11.53	keine	-	0,7 mg%	0,05 %
K 90	5	16.10. - 30.11.53	Lösung III	s.exp.Teil	1,3 mg%	0,17 %
K 90	4	16.10. - 1.12.53	Asparagin	0,01 mol	0,75 mg%	0,03 %
K 90	4	16.10. - 1.12.53	Asparagin	0,05 mol	0,85 mg%	0,05 %
K 90	5	16.10. - 2.12.53	Asparagin	0,1 mol	3,1 mg%	0,08 %
K 90	5	16.10. - 2.12.53	Tryptophan	0,005 mol	1,2 mg%	0,06 %
K 90	5	16.10. - 2.12.53	Tryptophan	0,01 mol	1,9 mg%	0,07 %
K 90	5	16.10. - 2.12.53	Tryptophan	0,025 mol	+	+

Abgesehen von der erheblichen Fehlerbreite bei der Blauwertbestimmung, deren Ursache im grundsätzlichen der Methode zu suchen ist, scheint die Alkaloiderzeugung bei obigem Versuch in jeder Reihe, verglichen mit dem gleichen Experiment vor fünf Monaten, zurückgegangen zu sein. Bei jeder Versuchsreihe ist jedoch die relative Steigerung des Wirkstoffgehaltes, bezogen auf die Kontrollreihe, ähnlich wie bei dem in Tabelle XV aufgezeigten Erstversuch annähernd die gleiche geblieben. Ob der hohe Blauwert in dem Mycel aus der Versuchsreihe, welche mit Spurenelementen zusätzlich beschickt war, als Reaktion des Pilzorganismus auf einen neuen Reiz zu werten ist, oder ob die Zusammenstellung dieser Schwermetalllösung den physiologischen Ansprüchen des Pilzes eher gerecht wird, mußte bei diesem einmaligen Versuch eine völlig offene Frage bleiben.

In Anbetracht der günstigen Wirkung der Schwermetalle wurde im November 1953 ein neuer Großversuch mit der Bezeichnung "V 240-242" in 400 Kolben angelegt. Wiederum wurden die Kolben mit der Dextrose-Peptonlösung beschickt, als Zusatz die "Lösung III" zugefügt und mit K 90 beimpft. Auch dieser Großversuch erwies sich im Verlauf der Kulturperiode als nicht voll befriedigend. Knapp die Hälfte aller Kolben wurden als "brauchbar" weiter aufgearbeitet, wobei es gelang, aus dem Feuchtmycel dieser Kulturgefäße 164 mg Rohalkaloidgemisch zu gewinnen.

Bei Untersuchungen in unserem Arbeitskreis wurde festgestellt, daß sich der Prozentsatz keimfähiger Konidien solcher Kulturen, die zur parasitischen Züchtung von Mutterkorn bestimmt waren, erheblich erhöhte, wenn man diese Ausgangskulturen einer Kältepassage bei 0° unterwarf. Auch H. Kirchhoff (7), G. Krebs (12) und G. Schweizer (13) konnten zeigen, daß für Sklerotien länger einwirkende tiefe Temperaturen als Fruktifikationsreiz wirkten. H. Kirchhoff berichtet, der Prozentsatz der Fruchtkörper treibenden Sklerotien sei direkt proportional der Temperaturtiefe und der Einwirkungsdauer. Nach G. Krebs bietet eine zwei- bis dreiwöchige Kälteeinwirkung von -1° das Optimum, wobei alle Sklerotien auskeimen. Eine weitere Verlängerung der Kältepassage vermindere diesen Prozentsatz wieder. G. Schweizer kann die Anzahl der fruktifizierenden Sklerotien durch Kältebehandlung auf das Vierfache steigern. Eine weitere Erhöhung der Rate war weder durch Temperaturerniedrigung auf -10° , noch durch rhythmischen Temperaturwechsel zwischen -10° und $+25^{\circ}$ zu erzielen. Der Autor stellte zur Gewinnung von Ascosporen die Sklerotien 20 bis 25 Tage auf Eis.

Es lag nach diesen aus der Literatur ersichtlichen Ergebnissen auch für meine Versuche der Gedanke nahe, die für die Anlage von Flüssigkulturen ausgewählten Impföhrchen einer ähnlichen Kältepassage bzw. einem Kälteschock zu unterwerfen. Um das Verhalten des Pilzorganismus bei extrem tiefen Temperaturen zu studieren, lagerte ich drei Wochen alte Schrägagaröhrchen für weitere zwei Wochen bei -30° im Tiefkühlschrank.

Mit diesen Stammkulturen von K 90 wurde sofort, ohne erst einen orientierenden Vorversuch anzusetzen, am 8. Januar 1954 ein neuer Großversuch angelegt. Er bestand aus 150 Kulturgefäßen mit der üblichen Dextrose-Peptonlösung, der ferner die Spurenelemente der Lösung III zugesetzt waren. Zur Kontrolle dienten 50 mit der gleichen Nährlösung und Spurenelementen beschickte Kolben. Sie wurden im Gegensatz zur Hauptversuchsreihe mit gleichaltrigen Stammkulturen, welche jedoch keiner Tiefkühlschrankpassage unterworfen worden waren, beimpft.

Während die Kontrollreihe im Laufe ihrer Entwicklung nur mäßiges Wachstum zeigte, war die Schnelligkeit des Wachses im Hauptversuch geradezu erstaunlich. Bereits nach 17 Tagen war in allen Kolben die Substratoberfläche mit kräftigem Pilzmycel überzogen, welches teilweise deutlich violette Flecken aufzuweisen hatte. Die Kontrollreihe blieb demgegenüber im Wachstum zurück. Es darf daher angenommen werden, daß der erfolgreiche Hauptversuch auf die der zweiwöchigen Kältepassage unterworfenen Impfkulturen zurückzuführen war. Aus dem Hauptversuch konnten 137 brauchbare Kolben abgeerntet werden. Auch die Kontrolle lieferte immerhin mit 41 Kolben, deren Mycel weiter verarbeitet werden konnte, einen erfreulich hohen Prozentsatz. Der durchschnittliche Blauwert im Kulturfiltrat der Kontrolle lag mit 0,5 mg% jedoch tiefer, als der Gehalt in der abfiltrierten Nährlösung des Hauptversuches mit 0,95 mg%. Nach methanolischer Extraktion der vereinigten Feuchtmycelien und Aufarbeitung der Extraktlösung, wie es im experimentellen Teil beschrieben ist, konnte ich 413 mg eines gelbweißen Rohalkaloidgemisches isolieren.

Anschließend sei noch über das Ergebnis mit einer anderen Pilztype berichtet. Von einem auf *Holcus mollis* gefundenen Sklerotium wurden saprophytische Kulturen angelegt, deren Extrakte sich mit dem Reagenz nach van Urk als stark blaufärbend erwiesen hatten.

Tabelle XX:

Stamm:	Anzahl der Kolben:	Wuchs- periode:	Nähr- substrat:	Pepton- sorte u. -charge:	Alkaloidnachweis	
					Nähr- lösung:	Mycel:
Ho	1	12.1. - 27.2.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton	"trypt. verd." (223 151)	1,6 mg%	0,09 %
Ho	1	12.1. - 23.2.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton	"trypt. verd." (223 151)	0,34 mg%	0,09 %
Ho	2	26.2. - 17.4.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton	Witte- Pepton	+	0,04 %
Ho	2	26.2. - 17.4.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton	"sicc. e carne"	-o-	-o-
Ho	1	9.4. - 28.5.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton	"trypt. verd." (232 518)	0,37 mg%	0,08 %
Ho	5	15.4. - 25.6.53	10 % Saccharose + 0,25 % Asparagin	-	-o-	-o-
Ho	5	15.4. - 25.6.53	10 % Saccharose + 0,5 % Asparagin	-	-o-	-o-
Ho	5	15.4. - 25.6.53	10 % Dextrose + 0,25 % Asparagin	-	-o-	-o-
Ho	5	15.4. - 22.6.53	10 % Dextrose + 0,5 % Asparagin	-	-o-	-o-
Ho	5	15.4. - 22.6.53	10 % Dextrose + 1 % Asparagin	-	-o-	-o-
Ho	5	15.4. - 22.6.53	10 % Dextrose + 1 % Leucin	-	-o-	-o-
Ho	5	7.5. - 2.7.53	10 % Dextrose + 2 % Pepton	"trypt. verd." (311 955)	-o-	-o-

Auch diese Type, im weiteren mit Ho bezeichnet, zeigte differenzierte Nährstoffansprüche, die erfüllt sein mußten, wenn der Pilz die Biosynthese von Alkaloiden in saprophytischer Kultur durchführte. Aus der vorstehenden Tabelle XX (siehe Seite 55) ist zu erkennen, daß die Type Ho ausschließlich mit Pepton als Stickstoffquelle in der Nährlösung Alkaloide erzeugte. Merkwürdigerweise mit solchen Peptonarten, bzw. von "tryptisch verdaulichem Fleischpepton" mit den Chargen, welche sich für die Klonkultur K 90 als nicht geeignet erwiesen hatten. Dagegen war es mir in keinem Fall möglich, diesen Pilzorganismus in saprophytischen Kulturen, die andere Stickstoffquellen als Pepton enthielten, zur Alkaloidproduktion zu veranlassen.

Lediglich in dem "tryptisch verdaulichem Fleischpepton" der Firma A, Chargennummer: 38 073, fand ich eine Stickstoffquelle, mit der sowohl K 90 als auch die Type Ho sich in saprophytischer Kultur als Alkaloidproduzenten erwiesen. Die Pilztype Ho unterschied sich auch in ihrer Wuchsform erheblich von den von mir geprüften Roggenmutterkorntypen. Ihr auf Dextrose-Pepton-Substrat gebildetes Mycel schwamm nicht auf der Nährlösung, sondern sackte ab, so daß der Pilz bald auf dem Boden des Kulturgefäßes aufsaß (Abb. 69). Hier ist das kräftige, kompakte Mycel deutlich zu erkennen. Abb. 70 zeigt dagegen das ausgesprochen kümmerliche Wachstum auf 10 % Dextrose + 1 % Leucin. Etwas kräftiger ist das Mycel auf Dextrose-Asparagin (10 % + 0,5 %) ausgebildet (Abb. 71). Bei Erhöhung der Asparaginkonzentration auf 1 % (Abb. 72) tritt sogar violette Pigmentierung auf der Unterseite des Hyphengewebes auf. Die Verfärbung bleibt aus, wenn die Dextrose durch die gleiche Konzentration an Rohrzucker ersetzt wird (Abb. 73).

Aufbauend auf den mit dem Klon K 90 gewonnenen Erfahrungen legte ich von der Type Ho am 24. Februar 1954 unter der Bezeichnung "V 265-266" in 200 Kolben einen Großversuch an. Als Nährsubstrat wurde die bewährte Dextrose-Pepton-Lösung verwendet mit dem bereits erwähnten tryptisch verdaulichem Fleischpepton, Chargennummer: 38 073. Ferner wurde dem Substrat die

Spurenelemente der Lösung III und überdies 0,25 % Asparagin zugefügt. Für 100 Kolben (Reihe A) wurden die zur Beimpfung ausgewählten Schrägagarröhrchen für zwei Wochen einer Tiefkühlschrankpassage bei -30° ausgesetzt. Die restlichen 100 Kolben (Reihe B) wurden mit normal behandelten Schrägagarröhrchen belegt. Ein Großteil der bei der saprophytischen Kultur von K 90 gewonnenen Erfahrungen wurden also unmittelbar auf einen Großversuch mit einer anderen Pilztype übertragen.

Am 5. April 1954 konnte der Versuch abgeerntet werden. Das Feuchtmycel mußte aus arbeitstechnischen Gründen getrocknet werden. Aus der Reihe A wurden 82 Kolben geerntet mit 232 g Trockenmycel, Reihe B mit 89 abgeernteten Kulturgefäßen lieferte 250 g Trockenmycel. Die Ausbeute an Trockenmycel pro Kulturgefäß ist demnach mit 2,85 g in der Reihe A und 2,8 g in der Reihe B nahezu gleich. Die Tiefkühlschrankpassage der Impfkulturen für Reihe A wirkte sich nicht in einer Wuchsgewichtsteigerung aus. Auch im Kulturfiltrat wurde in beiden Reihen mit 0,9 mg% an Blauwert der gleiche Alkaloidgehalt ermittelt. Dagegen liegt bei der Reihe A der Gehalt im Trockenmycel mit 0,05 % etwas tiefer als in der Reihe B, wo er mit 0,08 % ermittelt wurde. Es bedarf jedoch weiterer Versuche, um zu entscheiden, ob diese Differenz ihre Ursache in der Kältepassage der einen Versuchsreihe hatte. Aus dem Trockenmycel konnten 250 mg einer gelblichen amorphen Substanz von Alkaloidcharakter isoliert werden.

Mit diesen Versuchen war es gelungen mit DK Oll, bzw. K 90 eine Pilztype zu finden, welche in mehreren Generationen in der Lage war, in saprophytischer Kultur mit dem van Urk'schen Reagenz blaufärbende Substanzen zu bilden. Schon die Art der Aufarbeitung und die Eigenschaften der erhaltenen Rohprodukte deuteten mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen von Alkaloiden hin. Die erhaltenen Alkaloidgemische erwiesen sich, mit einer Ausnahme, bei der Aufarbeitung in ihrer qualitativen Zusammensetzung als gleich. Am Beispiel des Großversuches V 261-262 sei daher seine Auftrennung und die Identifizierung der einzelnen Alkaloide aufgezeigt.

Das erhaltene Rohalkaloidgemisch wurde in einer möglichst geringen Menge Methylenchlorid gelöst und über der 30-fachen Menge Aluminiumoxyd (nach Brockmann) chromatographiert. Bei der Reinigung über eine solche Kurzsäule tritt noch keine Auftrennung in die einzelnen Komponenten ein, jedoch werden weitgehend die Begleitstoffe und Verunreinigungen zurückgehalten, bzw. sie lassen sich mit trockenem Methylenchlorid leichter und schneller eluieren. Hier wanderte vor der eigentlichen Alkaloidfraktion eine unscharfe, im UV-Licht blau fluoreszierende breite Zone, deren Eluat gesondert aufgefangen, mit dem Alkaloidreagenz nach van Urk keine Blaufärbung hervorrief. Wesentlich langsamer wanderte dagegen eine unter der Quarzlampe intensiv blau fluoreszierende Zone, von deren Eluat ein Tropfen verdunstet und der Rückstand in 1 ml Eisessig wieder gelöst wurde mit dem Reagenz nach van Urk eine tiefblaue Farbe erzeugte. Das Eluat wurde gesondert aufgefangen und das Methylenchlorid bis auf einige ml bei Zimmertemperatur abdunsten lassen. Unter Turbinieren wurde das Konzentrat in 50 ml Petroläther eingegossen. Das ausgefallene Alkaloidgemisch ergab abzentrifugiert, getrocknet: 413 mg. Polarimetrisch wurde $[\alpha]_D^{20} = +358^\circ$ gefunden.

Ein Versuch, einen Teil des vermutlichen Ergotaminin in Ergotaminsulfat umzulagern, um die Base zu identifizieren, ergab nur eine Ausbeute von 14,3 %.

Zur weiteren Reinigung und Auftrennung wurden daher 305 mg Wirkstoff in Methylenchlorid gelöst und diese Lösung über die 166-fache Menge Aluminiumoxyd (nach Brockmann) chromatographiert. Ab Säulenmitte trennte sich die Substanz in zwei unter der Analysenquarzlampe hellblau fluoreszierende Zonen auf. Die erste leicht eluierbare ergab die Hauptmenge mit 259 mg und zeigte bei der Polarisierung einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +346^\circ$. Aus Methanol kristallisierte das Alkaloid in den für Ergotaminin charakteristischen fünfeckigen Platten (Abb. 60). In der Mutterlauge kristallisierte neben dem beschriebenen Ergotaminin noch Nadelbüschel aus (Abb. 61). Herauspräpa-

riert ergaben sie einen Schmelzpunkt unter Zersetzung von 228° bis 230° , während die Ergotamininkristalle einen Zersetzungspunkt von 230° bis 238° aufwiesen. Offensichtlich war also die erste Fraktion noch nicht einheitlich.

Eine erneute chromatographische Trennung trennte sie jedoch dann auf in einen vorweglaufenden Anteil von 36,4 mg, mit dem spezifischen Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +387^{\circ}$. Diese Verbindung kristallisiert aus Methanol in Nadeln und erweist sich papierchromatographisch als Ergocristinin mit geringen Mengen von Ergocristin, Ergotaminin und höchstens Spuren Ergotamin verunreinigt. Die Hauptmenge von 206 mg bestand nach den papierchromatographischen Untersuchungen aus Ergotaminin. Aus dieser Fraktion konnte durch Umlagerung zum schwerlöslichen Sulfat das Ergotaminsulfat in einer Ausbeute von insgesamt 59 % gewonnen werden. Hieraus wurde die Base freigemacht und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Drehung der Chloroformlösung ließ, nachdem das Lösungsmittel abgedunstet und der Rückstand gewogen wurde einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = -145^{\circ}$ errechnen.

Die aus dem Chloroformrückstand hergestellte Aceton-Wasser-Verbindung kristallisierte in charakteristischen kurzen, dicken Prismen mit lichtbrechender Kante (Abb. 64 und 65). Sie schmolzen unter Zersetzung zwischen 169° und 172° . Papierchromatographisch wurde die Verbindung als Ergotamin identifiziert.

Die bei der ersten chromatographischen Auftrennung erhaltene zweite Fraktion von 19,5 mg konnte an der 150-fachen Menge Aluminiumoxyd (nach Brockmann) aufgetrennt werden in Ergotaminin (Abb. 66) und Ergotamin. Von letzterem wurde die Ausbeute von 8,5 mg als Aceton-Wasser-Verbindung kristallisiert (Abb. 67 und 68). Im Papierchromatogramm wurde die Substanz als Ergotamin erkannt.

Aus dem Rohalkaloidgemisch, welches sich aus dem Großversuch V 265-266 der Pilztype Ho ergeben hatte, wurden bei der Mikrokristallisation aus Äthanol und Aceton Kristallformen erhalten, die auf Ergocristinin deuteten (Abb. 74 bis 77). Der Schmelz-

punkt dieser Kristalle lag unter Zersetzung bei 218° bis 221° . In einem Vorversuch wurden 50 mg Substanz durch Kochen in methanolischer Phosphorsäure in Ergocristinphosphat umgelagert. Das erhaltene Produkt konnte durch Umkristallisieren aus Methanol in viereckigen Platten erhalten werden (Abb. 78 und 79), die einen Schmelzpunkt von 185° - 187° unter Zersetzung aufwiesen. Der Hauptteil der Rohalkaloide wurde einer erneuten Reinigungsoperation unterworfen. Hierzu wurden sie in Methylenchlorid gelöst, mit Äther verdünnt, und diese Lösung mehrere Male mit 5 %iger wässriger Weinsäure ausgeschüttelt. Aus den vereinigten weinsäuren Auszügen wurde das Alkaloid mit Ammoniak gefällt und getrocknet.

Aus 100 mg dieser Substanz konnten durch halbstündiges Kochen am Rückfluß in äthanolischer Phosphorsäure 65,4 mg Ergocristinphosphat gewonnen werden. Eine Probe davon, aus 90 % Äthanol umkristallisiert, zeigte neben rhombischen Kristallen die in der Literatur beschriebenen Sechsecke, sowohl langgestreckt (Abb. 80) mit scharfen Konturen, als auch mit abgerundeten Ecken (Abb. 81). Der Schmelzpunkt dieser Kristalle lag bei 186° bis 187° (Zersetzung).

Zur weiteren Identifizierung wurde die Papierchromatographische Trennung für Ergotoxin von A. Stoll (38) herangezogen. Als Vergleichssubstanzen wurden gleichzeitig chromatographiert: Ergocristin "Merck", Ergocristin einer anderen Firma, Ergocristinphosphat und das zu identifizierende Ergocristinphosphat aus dem Großversuch V 265-266. Die erhaltenen R_F -Werte waren untereinander gleich und bewiesen somit das Vorliegen von Ergocristin.

Die Isolierung der Alkaloide Ergotamin und Ergocristin aus saprophytischen Kulturen von *Claviceps purpurea* beweist eindeutig die Fähigkeit des Pilzes zur Synthese dieser Wirkstoffe im genannten Milieu. Damit war die erste Aufgabe, die ich mir in dieser Arbeit gestellt hatte, gelöst. Daß diese Frage in bejahendem Sinne beantwortet werden würde, wurde schon während meiner Arbeit wahrscheinlich, da in dieser Zeit von anderen

Autoren wesentliche Beiträge zu diesem Problem geleistet wurden. So gelang es als erstem dem Japaner M. Abe (18) von einem auf *Agropyrum*- und *Trisetum*-Arten gefundenen Mutterkorn saprophytische Kulturen anzulegen, in denen der Pilz ein bisher nicht bekanntes Alkaloid, das Agroclavin, erzeugt. Diese Verbindung wird von derselben Pilztype auch bei parasitischem Wachstum gebildet. Einige Zeit später fand der nämliche Autor mit seinen Mitarbeitern (22) einen auf *Elymus mollis* parasitierenden Pilz, welcher sowohl in der Natur als auch saprophytisch befähigt war, neben Ergokryptinin und Ergokryptin sowie Spuren von Ergosinin, Agroclavin und eine weitere bislang unbekannte Base, das Elymo-clavin, zu bilden. Damit wurden neben den neuen Wirkstoffen zum ersten Mal in saprophytischer Kultur auch Vertreter der klassischen Mutterkornalkaloide aufgefunden. In jüngster Zeit konnten A. Stoll und Mitarbeiter (40) Agroclavin auch aus den auf der afrikanischen Kolbenhirse *Pennisetum typhoides* Rich. gefundenen Sklerotien isolieren. Der aus ihnen gezüchtete Pilz bildete in saprophytischer Kultur neben Agroclavin und Elymo-clavin ein weiteres bisher unbekanntes Alkaloid, das Penniclavin. Mit diesen Arbeiten hatten sich von Gräsern herkommende Mutterkornpilze, saprophytisch wachsend, als alkaloidbildend erwiesen. Diese Ergebnisse werden gestützt und erweitert durch die in dieser Arbeit unter ähnlichen Bedingungen nachgewiesene Produktion von Ergocristin durch eine auf *Holcus*-Arten gefundene *Claviceps*-type.

Interessanter jedoch ist das in vorliegender Arbeit erzielte Resultat, daß auch Pilztypen, welche in der Natur auf Roggen parasitieren, unter saprophytischen Bedingungen Alkaloide zu bilden vermögen. Wenn es aus der Klonkultur K 90 zum ersten Male gelang, neben Ergocristin das therapeutisch wichtigste aller Mutterkornalkaloide, das Ergotamin, in befriedigender Menge zu isolieren und zu identifizieren, so halte ich dieses Ergebnis für bedeutsam.

Die zweite Frage, welche Faktoren die Alkaloidsynthese im saprophytischen Milieu beeinflussen oder grundsätzlich erst ermöglichen, ist zur Zeit noch nicht umfassend zu beantworten. Mit Wahrscheinlichkeit wird die Alkaloidbildung als Teil des Stoffwechselgeschehens durch bestimmte Erbanlagen festgelegt und gesteuert. Das- oder diejenigen Gene, welche die Alkaloidproduktion des Pilzes bei parasitischem Wachstum determinieren, sind sicherlich auch für die Synthese der Wirkstoffe in saprophytischer Kultur verantwortlich. Dafür spricht, daß bei parasitischem Wachstum als negativ (nicht alkaloiderzeugend) erkannte Typen, auch bei saprophytischer Kultur bisher niemals positiv gefunden worden sind. Andererseits findet man bei der Anlage von Pilzkulturen aus alkaloidhaltigen Mutterkörnern nur in einem Teil der Mycelien eine Wirkstoffproduktion. So hatte ich zunächst die saprophytischen Folgekulturen von mehr als hundert Roggen- und Grasmutterkörnern verschiedenster Provenienz geprüft, bis ich vier positive Typen fand. Davon waren zwei Vertreter in ihrem Alkaloidgehalt so gering, daß sie für meine Versuche ausscheiden mußten, und ich mich bei den weiteren Experimenten ausschließlich auf die beiden beschriebenen Pilztypen DK 011 bzw. K 90 und Ho beschränken mußte. Dieser Befund dürfte die Erklärung dafür sein, daß viele in der Literatur beschriebene Arbeiten über den gleichen Gegenstand ein negatives Resultat hatten. Die Mehrzahl dieser Autoren hat nur wenige oder sogar nur ein einziges Sklerotium zur Stammkultur herangezogen und mit den Folgekulturen Untersuchungen angestellt. Mit den so erzielten Ergebnissen wurde dann die Aussage über die Alkaloidbildung "in vitro" fundiert.

Abgesehen von der Erbanlage ist meines Erachtens eine derartige Alkaloidbildung wesentlich von den dem Organismus dargebotenen Nährstoffen und unter diesen besonders von der Stickstoffquelle abhängig. Zumindest scheint dies aus meinen Untersuchungen hervorzugehen, bei denen sowohl die Type DK 011, als auch der Tochterklon K 90 und ebenfalls die

Grasmutterkorntype Ho nur mit ganz bestimmten Stickstoffverbindungen, insbesondere Peptonen, Alkaloide gebildet haben. Lagen Nährsubstrate mit anderen Stickstoffverbindungen vor, so waren weder im Mycel noch im Kulturfiltrat Alkaloide nachzuweisen. Auch der Bedarf an Zusatzfaktoren ist sicher von Bedeutung.

Zu diesen zweifellos sehr wesentlichen Bedingungen und Voraussetzungen zählen ferner die Versorgung mit Sauerstoff, die Belichtung und eine optimale Wuchstemperatur. Auch der Feuchtigkeitsgehalt der Raumluft muß ausreichend hoch sein. Ist er zu gering, so verdunstet aus dem Nährsubstrat Wasser in größerer Menge, wodurch die vermutlich das Wachstum ungünstig beeinflussenden Stoffwechsel-Endprodukte des Pilzes in unerwünschter Weise konzentriert werden. Somit ergeben sich als weitere Aufgaben die Ernährungsphysiologie der gefundenen Alkaloidbildner zu studieren und den Einfluß der Umweltfaktoren für ein optimales Wachstum in Großversuchen kennen zu lernen. Es erscheint mir wenig angebracht, zu den in meinen Versuchen erhaltenen Blauwerten Stellung zu nehmen. Einmal ist das experimentelle Material dafür wohl nicht umfangreich genug, wie auch die Methodik zur Erzielung dieser Werte als nicht exakt und gleichmäßig genug angesehen werden kann. Dazu kommt weiter als Unsicherheitsfaktor für quantitative Betrachtungen die Möglichkeit, daß in der Pilz-zelle gebildetes Alkaloid in die Nährlösung abgegeben und dort abgebaut wird. Dann würde bei einer quantitativen Verfolgung mit der angewandten Arbeitsweise nur ein bestimmter Teil erfaßt werden.

Die dringendste Frage aber, die zu prüfen ist, gilt der genetischen Einheitlichkeit der Konidienklone. Nur wenn die Sporen einkernig sind, können sie als Ausgangsmaterial zur vergleichbaren Analyse von Kulturen dienen. Im anderen Falle müßte von Ascosporen-Klonen ausgegangen werden.

EXPERIMENTELLER TEIL
=====

1. Zusammensetzung und Herstellung von Nährsubstraten,
Spurenelementlösungen und ihre Sterilisation.

a) Nährlösung nach R. Jeretzky (10):

KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Pepton "trypt. verd."	20,0 g
Dextrose	100,0 g
dest. Wasser	ad 1000,0 g

b) Nährlösung nach H. Kirchhoff (7):

KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
KNO_3	0,5 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,0 g
NH_4Cl	0,25 g
Dextrose	50,0 g
dest. Wasser	ad 1000,0 g

c) Nährlösung nach M. Abe (18):

KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g
Ammon. Succinat	7,0 g
Mannit	50,0 g
dest. Wasser	ad 1000,0 ml
mit NH_4OH auf $\text{p}_\text{H} = 5,2$ einstellen	

Durch Zusatz von 2 % Agar-Agar werden aus den vorstehend beschriebenen Nährlösungen die entsprechenden Nährböden hergestellt.

Zur Herstellung der Nährböden werden 20 g Agar-Agar in einem Überschuß an Wasser über Nacht vorgequollen, das überschüssige Wasser wird abgegossen und nach Zusatz der Nährlösungsbestandteile soviel Wasser zugefügt, daß 1 kg Nährbödensubstrat resultiert. Im Autoklaven oder Dampftopf wird solange erhitzt, bis die Lösung klar erscheint. Mit 1 Kilogramm heißem und noch flüssigem Nähragar werden ca. 900 gewöhnliche Reagenzgläser zu einem Drittel ihres Volumens gefüllt, in senkrechter Lage sterilisiert und anschließend der Inhalt in leichter Schräglage erstarren lassen.

Die Nährlösungen in Erlenmeyerkolben und die Nährböden in Reagenzgläsern werden im Autoklaven bei 0,4 - 0,6 atü, das entspricht 110° - 114°, mit gespanntem Wasserdampf 15 - 20 Minuten sterilisiert.

d) Spurenelementlösung I
nach G. Beadle und E. Tatum (35):

NH_4NO_3	1,0	g
KH_2PO_4	2,0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5	g
CaCl_2	0,1	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	0,088	mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,392	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,072	mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,81	mg
dest. Wasser	ad 1000,0	g

Durch Auflösen von 20 g Pepton und 100 g Dextrose in obiger Lösung erhält man 1 kg Nährlösung nach R. Jaretsky mit Spurenelementen.

e) Mineralisierung von Mutterkorn der Type DK 011:

70 g Mutterkornsklerotien des Stammes DK 011 wurden in einer Platinschale unter Anwendung rauchender Salpetersäure mineralisiert. Der Rückstand ergab nach qualitativer und ungefährender quantitativer Analyse, die Anwesenheit folgender Elemente:

Titan, Kupfer, Aluminium, Eisen, Phosphor, Mangan, Silizium, Calcium, Magnesium, Natrium und Kalium.

In dieser Reihenfolge sind die Elemente in mengenmäßig steigender Anordnung aufgeführt. Auf diesem Ergebnis aufbauend wurde hergestellt:

f) Spurenelementlösung II:

TiOSO_4	0,033 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,39 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	14,8 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	15,0 mg
SiO_2	6,0 mg
CaCl_2	20,0 mg
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	90,0 mg
Nährlösung	ad 100,0 g

g) Spurenelementlösung III (modifiziert nach H. D. Michener und N. Snell):

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,023 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,009 mg
ZnCl_2	0,029 mg
Nährlösung	ad 100,0 g

2. Gewinnung von Ausgangskulturen aus Sklerotien.

Die Mutterkörner, die zur Gewinnung von saprophytischen Stammkulturen ausgesucht worden waren, wurden zunächst 15 Minuten in ein mit 0,1 %iger Sublimatlösung gefülltes Porzellanschälchen gelegt. Nach dieser Einwirkungszeit übertrug ich sie mit Hilfe einer abgeflamten Pinzette in

ein zweites, steriles Wasser enthaltendes Schälchen. Hier wurde mit einem Skalpell vorsichtig die violette Rindenschicht abgekratzt. Anschließend teilt man die Sklerotien in ca. 0,5 - 1,0 mm dicke Scheibchen und bringt mit einer sterilen Pinzette oder einer Impfnadel je 2 Scheibchen auf die Oberfläche eines Schrägagarröhrchens.

Bei Grasmutterkörnern wurden die Sklerotien in 70 %igem Äthanol, das 7 % Formaldehyd enthält, 20 Minuten gebadet. Danach wurden sie je nach Länge und Breite so zerschnitten, daß 1 - 2 mm breite Scheibchen, bzw. zylindrische Teilstückchen entstanden. Diese wurden kurz durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen und sofort, ohne Entfernung der gefärbten Rindenschicht auf Schrägagarröhrchen überführt. Die Desinfektionslösung wurde wie folgt hergestellt:

Äthanol (96 %)	70,0 g
Formaldehyd. solut. (35 %)	20,0 g
dest. Wasser	6,0 ml

Ist das Scheibchen zu einem pfennigstückgroßen Mycel ausgewachsen, kann es vermehrt werden. Mit einer abgeflamnten Impfnadel wird vorsichtig über das Hyphengeflecht gestreift, wobei zahlreiche Konidien, evtl. auch ganze Hyphenfäden an der Nadel haften bleiben. Durch wellenförmiges Abstreifen der Nadel auf der Oberfläche eines frischen Agarröhrchens wird die Übertragung durchgeführt. Die Vermehrung solcher aus Primärkulturen entstandener Folgekulturen geschieht in gleicher Weise.

Grundsätzlich erfolgte die Neuanlage von Kulturen und die Vermehrung (Überimpfung) in der Impfkabine. Zur Keimherabsetzung der Raumluft wird der Arbeitsraum vorher und während der arbeitstechnischen Prozeduren mit UV-Licht ausgestrahlt (Sterisollampe der Quarzlampengesellschaft "Hanau"). Das Maximum der emittierten Strahlung hat eine Wellenlänge von 254 m μ , welche als besonders wirkungsvoll gelten.

3. Anlage von Einsporkulturen.

Petrischalen ($\varnothing = 10$ cm) werden im Lufttrockenschrank bei 160° 2 Stunden sterilisiert und jede Schale mit dem Inhalt eines aufgeschmolzenen Schrägagarröhrchens ausgegossen. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird von einer auf Schrägagar gehaltenen Stammkultur Konidienmaterial mit einer Impfnadel abgeimpft und die an der Öse haftenden Sporen durch kreisförmiges Streifen und leichtes Klopfen mit dem Zeigefinger auf den Nährboden in der Petrischale übertragen. Durch das Klopfen werden einzelne Konidien weggeschleudert, liegen meist einzeln und sind besser zu isolieren. Die Schale wird zugedeckt und etwa 24 bis 48 Stunden stehen gelassen. Haben die aus den Sporen austretenden Keimschläuche etwa die 4- bis 6-fache Länge der Konidie erreicht, werden sie isoliert. Man bringt die Petrischale unter das Objektiv einer Stereolupe (Abb. 31), öffnet den Deckel und sticht mit einem Mikrospatel vorsichtig um die gekeimte Konidie herum durch bis auf den Boden, so daß man letztlich ein ganzes Agarklötzchen, auf dem die ausgekeimte Spore liegt, herausheben und auf ein anderes frisches Schrägagarröhrchen übertragen kann. Als Mikrospatel dient das breitgeklopfte, glatt geschnittene Ende eines Platindrahtes.

4. Allgemeine analytische Bestimmungen.

a) Dextrosebestimmung:

Zur Dextrosebestimmung nach Th. M. v. Fellenberg (27) werden je 10 ml Fehlinglösung I und II in einen Erlenmeyerkolben von 200 ml Inhalt pipettiert, mit 20 ml Wasser verdünnt und zum Sieden erhitzt. Eine abgemessene Menge Nährlösung, welche je nach ihrer Dichte zwischen 1 und 3 ml liegt, wird in einem Strahl in die siedende alkalische Kupfersulfatlösung gegeben und das Ganze genau 2 Minuten im Sieden gehalten. Nach Abkühlen unter fließendem Leitungswasser wird durch ein Filtertiegel (Porenweite: A-3) abgesaugt. Das Filtrat muß noch deutlich

blau gefärbt sein, da bei dieser Bestimmung die Fehling'sche Lösung im Überschuß vorliegen muß. Der Niederschlag von Cuprooxyd wird anschließend mehrmals mit heißem Wasser, dann mit Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen. Im Vakuumtrockenschrank wird bei 50° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die dem Gewicht des Cuprooxydes äquivalente Dextrosemenge wird einer Umrechnungstabelle entnommen.

b) Der qualitative Alkaloidnachweis:

Das zu untersuchende Pilzmycel wird durch Abfiltrieren von der Nährlösung getrennt und durch sofortiges Abpressen zwischen Filtrierpapier von dem größten Anteil Feuchtigkeit befreit. Nach Wägung des ausgepressten Feuchtmycels wird die halbe Gewichtsmenge unter Zusatz von 0,5 g kristallisierter Soda mit der doppelten Gewichtsmenge Seesand zu einer homogenen Masse verrieben und danach direkt in die Reibschale die 15- bis 20-fache Gewichtsmenge Methylenchlorid zur Mazeration gegeben. Unter öfterem Durchrühren und -reiben wird eine halbe Stunde ausgezogen. Die Extraktlösung wird durch ein Faltenfilter in ein Rundkölbchen filtriert, Reibschale samt Filter mit Rückstand mit einigen Millilitern Methylenchlorid nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird mit 0,5 ml Eisessig aufgenommen, mit 4,5 ml 5 %iger wässriger Weinsäure verdünnt, filtriert und vom Filtrat 2 ml mit 4 ml des Reagens nach van Urk versetzt. Bei positivem Ausfall der Probe wird die andere Hälfte Feuchtmycel bei Zimmertemperatur getrocknet und der Alkaloidgehalt quantitativ ermittelt.

c) Quantitative Alkaloidbestimmung aus dem Trockenmycel:

Des getrocknete Mycel wird fein gepulvert und 1,0 g mit 5 ml methanolischer Weinsäure, die sich wie folgt zusammensetzt:

Weinsäure	2 g
Wasser	38 ml
Methanol	ad 100 ml

in einem Perkulationsröhrchen (Länge: 20 cm, lichte Weite: 14 mm) mit Schliffhahn 3 bis 4 Stunden unter öfterem Umrühren mit einem Glasstab mazeriert. Danach wird mit weiteren 15 ml des Menstruums perkoliert, bei einer Abtropfgeschwindigkeit von 2 bis 4 Tropfen pro Minute.

Das Perkolat wird mit 10 %igem Ammoniak auf $P_H = 7,8$ bis 8,0 gestellt und dreimal mit je 10 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die drei Ausschüttelungen werden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, der Rückstand mit 1 ml Eisessig aufgenommen, mit 9 ml 5 %iger Weinsäurelösung verdünnt und filtriert. 2 ml des Filtrats werden mit 4 ml Reagenz nach van Urk versetzt, gut gemischt und nach 15 Minuten die Extinktion der entstandenen Blaufarbe im Elko II (Fa. Zeiss) bei 1 cm Schichtdicke unter Verwendung des Filters S 57 gemessen. Dieser Blauwert, eine Konzentrationsangabe, wird einer mit reinem Ergotamin aufgestellten Eichkurve entnommen. Alle quantitativen Blauwertsangaben sind also auf Ergotaminbase bezogen.

d) Quantitative Alkaloidbestimmung aus dem Kulturfiltrat:

Nach Abfiltrieren des Mycels wird in der Nährlösung der P_H -Wert ermittelt (Spezialindikatorpapier "Merck"). Durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von 10 %igem Ammoniak wird schwach alkalisch gestellt ($P_H: 7,8 - 8,0$). 100 ml des Filtrates werden dann dreimal mit je 50 ml Methylenchlorid vorsichtig ausgeschüttelt. Bei kräftigem Schütteln kommt es leicht zur Emulsionsbildung. Ist eine Emulsion entstanden, dann wird den vereinigten emulgierten Fraktionen etwa 5 % Äthanol zugesetzt und jetzt kräftig geschüttelt. Hierbei wird meist ein glattes Aufrahmen erreicht. Die klare Methylenchloridlösung wird wie üblich im Vakuum vorsichtig zur Trockne eingeengt, der Rückstand

mit 1 ml Eisessig aufgenommen, mit 9 ml 5 %iger Weinsäurelösung verdünnt, filtriert und 2 ml des Filtrates mit 4 ml Reagenz nach van Urk gemischt. Die Messung der Blauwertextinktion erfolgt wiederum nach 15-minütigem Stehen. Der Alkaloidgehalt wird der gleichen Eichkurve entnommen.

e) Fettbestimmung im Trockenmycel:

1 bis 2 g fein gepulvertes Mycel wird genau gewogen und in einem 100 ml-Erlenmeyerkölbchen zweimal je 15 Minuten mit der 10-fachen Gewichtsmenge Petroläther ausgezogen, getrocknet und zurückgewogen. Der Gewichtsverlust in Prozent wird gleich Fettgehalt gesetzt.

5. Gewinnung von Alkaloidkonzentraten aus Nährlösung und Mycel der Großversuche.

Die bei den Großversuchen anfallenden Mycelien wurden samt Nährlösung auf Nylonnetze von der Maschenweite 1 mm gegeben und abtropfen lassen. Das auf dem Gewebe verbliebene Mycel wird von Hand ausgepreßt und durch Sieb III geschlagen. 10 Feuchtmycel werden genau abgewogen und die Feuchtigkeit durch Trocknen bei 105° im Trockenschrank ermittelt. Der Feuchtigkeitsgehalt solchermaßen abgepreßten Mycels liegt meist zwischen 85 % bis 90 %. Danach wird die im gesamten Feuchtmycel vorhandene Wassermenge berechnet und soviel Methanol und kristallisierte Weinsäure zugesetzt, daß die schon angeführte weinsäure methanolische Extraktionslösung resultierte. In einer 10 l-Flasche wird der Ansatz über Nacht mazeriert und am nächsten Tag in eine Perkulationsröhre ($\varnothing = 8$ cm, Höhe = 1 m, Fassungsvermögen rund 5 Liter) eingegossen und der Abtropfhahn ganz geöffnet. Nach Zugabe frischen Menstruums wird weiterperkoliert und die Abtropfgeschwindigkeit auf 30 Tropfen/Minute geregelt. Die Extraktion wird als beendet und die Droge als erschöpft angesehen, wenn eine Probe von 50 ml, ammoniakalisiert wie üblich und dreimal mit dem halben Volumen Methylenchlorid ausgeschüttelt nach Abdampfen des Lösungsmittels im Rückstand

einen Blauwert ergibt, der auf das Milliliter des Perkolates umgerechnet weniger als 5 Gamma betragen muß. Das Perkolat wird gut durchgeschüttelt und wie bei der quantitativen Alkaloidbestimmung aus dem Trockenmycel der Blauwert einer Mischprobe ermittelt. Nach Ammoniakalisieren des Perkolates wird es in Anteilen zu 3 Litern mit 1,5 Litern Methylenchlorid ausgeschüttelt. Dabei wird ca. 90 % des Blauwertes in die organische Phase geschüttelt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, bis eine dunkelbraune, sirupöse Masse zurückbleibt. Man löst sie in 100 ml einer Mischung gleicher Volumenteile Äther p. n. + Petroläther (diese Mischung wird vorher durch Schütteln mit 5 %iger Weinsäurelösung gesättigt), dabei scheiden sich meist braunschwarze Flocken ab. Ohne Rücksicht darauf wird die Äther-Petrolätherlösung fünfmal mit je 20 ml 5 %iger Weinsäurelösung ausgeschüttelt. Nach Vereinigung und Filtration der weinsäuren Auszüge wird 1 ml abpipettiert und der Blauwert ermittelt. Nach Ammoniakalisieren ($P_H = 7,8 - 8,0$) der weinsäuren Lösung, wobei meist Trübungen durch die ausfallenden Basen auftreten, wird viermal mit je 30 ml Methylenchlorid ausgezogen, die Auszüge nach Vereinigung vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand, das Rohalkaloidgemisch, gewogen.

Zur Aufarbeitung des Kulturfiltrates wird zunächst die Gesamtmenge an Nährlösung gemessen, mit 10 %igem Ammoniak schwach alkalisiert ($P_H = 7,8 - 8,0$) und in Anteilen zu je 3 Litern mit je 1,5 Litern Methylenchlorid einmal 10 Minuten ausgeschüttelt. Die emulgierten Auszüge werden durch Zusatz von 5 % Äthanol und kräftiges Schütteln geklärt. Die klare gelb gefärbte organische Lösung wird abgetrennt. Die sich oben abgesetzt habende wässrige braune Nährlösungsschicht wird dekantiert und die meist vorhandene noch emulgierte Zwischenschicht mit dem gleichen Volumen frischen Lösungsmittel versetzt und nochmals kräftig geschüttelt. Es trennt sich dabei die restliche Emulsion und die klare Lösung wird mit der ersten Abtrennung zum Einengen vereinigt. Der Rückstand wird in einigen Millilitern trockenen Methylenchlorids

aufgenommen und über eine Aluminiumoxydkurzsäule gereinigt. Im Eluat wird nach Abdunsten des Lösungsmittels die Rohalkaloidausbeute gewogen.

6. Papierchromatographische Untersuchungen.

a) Rundfiltermethode:

400 ml n-Butanol (frisch destilliert) werden mit 100 ml Eisessig versetzt und mit 500 ml Wasser geschüttelt. Man läßt die wässrige Phase absitzen und trennt sie von der organischen Lösung ab. 100 ml der wassergesättigten Butanol-Eisessigmischung werden in eine Petrischale ($\varnothing = 13,5$ cm) gegeben. Rundfilter (Papier: Schleicher & Schüll 2045 b, $\varnothing = 16$ cm) werden im Zentrum markiert und hier mittels einer Kapillare oder Blutzuckerpipette soviel Alkaloidlösung aufgetragen, daß die absolute Menge etwa 50 Gamma entspricht. Nach Einschneiden eines 6 - 8 mm breiten Streifens von der Peripherie zum Zentrum hin, der nach Abknicken als Docht zum Ansaugen der Entwicklerflüssigkeit dient, wird das Rundfilter auf die Schale gelegt und durch den umgekehrt darüber gelegten Deckel festgehalten. Die Laufzeit ist abhängig von der Dochtbreite und beträgt im allgemeinen etwa 4 Stunden. Grundsätzlich soll abgebrochen werden, wenn die Lösungsmittelfront bis auf 3 cm an die Peripherie vorgedrungen ist. Das Chromatogramm wird an der Luft getrocknet und die R_F -Werte der Alkaloide, die sich als konzentrische Kreise zu erkennen geben, unter der Quarzlampe ausgewertet.

b) Segmentchromatogrammmethode nach W. Merz (41):

21 g Citronensäure werden in einem 1000 ml-Meßkolben unter Zusatz von 200 ml n-Natronlauge gelöst und bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. 684 ml dieser Lösung werden mit 266 ml n/10-Salzsäure gemischt und dieser Pufferlösung 50 ml einer Mischung gleicher Volumenteile Aceton und Äthylacetat zugesetzt. Dieses Elutionsmittel, mit "Ergotamin-Trennungsgemisch" bezeichnet,

wird ebenfalls in Mengen zu je 100 ml in die gleichen wie unter a) beschriebenen Petrischalen gegeben. Auch als Rundfilter gelangen die gleichen, wie sie bereits beschrieben wurden, zur Verwendung. Um das Zentrum wird mit einem Zirkel ein Kreis mit dem Durchmesser von 2 cm gezogen. Dieser Kreisbogen gilt als Startlinie. Auf ihm wird in alternierender Folge die zu untersuchende Substanz und eine Testsubstanz in Mengen von ca. 50 Gamma aufgetragen. Die Weiterbehandlung, wie Einschneiden des Dochtes, Dochtbreite, Einhängen in die Schale, Laufzeit usw. wird wie unter a) beschrieben durchgeführt.

c) Bogenchromatogramme nach K. Macek (37) und Mitarbeitern (modifiziert):

Auf den Boden einer Chromatographierkammer (Höhe: 75 cm, Breite: 60 cm, Tiefe: 30 cm) wird zur Sättigung der Atmosphäre eine Kristallisierschale mit 500 ml trockenem frisch destillierten Benzol gestellt. Papierbogen (Schleicher & Schüll 2043 b, 30 cm x 30 cm) werden durch eine 40 %ige Lösung von Formamid in Aceton (v/v) einmal durchgezogen und der Bogen zum Abtropfen und Antrocknen aufgehängt. 8 cm vom oberen Rand befindet sich die Startlinie. Auf ihr werden die Alkaloide in 1- bis 2 %iger Lösung aufgetragen in Menge von 1 cmm mit der Blutzuckerpipette. Die aufgetragene Menge beträgt dann etwa 10 bis 20 Gamma. Zur Identifizierung werden Reinalkaloide in gleicher Konzentration und Menge aufgetragen und mitlaufen lassen. Nach Einhängen des Bogens in die Wanne wird mit trockenem Benzol als Elutionsmittel absteigend chromatographiert. Die Laufzeit für die beschriebene Bogengröße beträgt 4 bis 5 Stunden. Nach dem Trocknen der Bögen können die Alkaloidflecke mit UV-Licht sichtbar, angezeichnet und die R_F -Werte ausgerechnet werden.

d) Papierchromatogramme nach A. Stoll (38):

Papierbögen (Schleicher & Schüll 2043 b, 30 cm x 15 cm) werden durch einmaliges Eintauchen in eine 10 %ige Lösung von Phthalsäuredimethylester in Diisopropylalkohol (v/v) imprägniert und zum Trocknen aufgehängt. Nach 10 Minuten trägt man auf einer 2 cm vom unteren Rand befindlichen Startlinie die Alkaloide und Vergleichssubstanzen in Konzentration und Menge wie unter c) beschrieben auf.

Die Herstellung der mobilen Phase zur Trennung der Alkaloide der Ergotamingruppe erfolgt durch Mischung von 4 Teilen Formamid und 6 Teilen Wasser (v/v) und Einstellen des p_H auf 5,2 mit Ameisensäure. (Klein- p_H -Meßgerät "Phywe" mit Glaselektroden). Die Entwicklerlösung wird mit einer geringen Menge Phthalsäuredimethylester zur Sättigung geschüttelt und durch Filtration vom überschüssigen Ester abgetrennt. Man gibt die so vorbereitete mobile Phase in eine Petrischale ($\varnothing = 13,5$ cm) und stellt diese in die Chromatographierkammer. Als solche hat sich ein Glaszylinder ($\varnothing = 20$ cm, Höhe = 40 cm) bewährt. Als Boden wird eine geschliffene Glasplatte verwendet, auf der die Schale mit der mobilen Phase steht. Nach oben wird der Zylinder durch einen Exsikkatordeckel abgeschlossen. Im Tubus trägt dieser einen einfach durchbohrten Korkstopfen, durch dessen Bohrung der Längsteil eines T-förmigen Glasstabes geführt ist. In der Kammer befindet sich der Querteil des T-Stückes, das also auf dem Kopf steht. Daran wird der Papierbogen nach Imprägnierung und Auftragen der Alkaloide gehängt. Man läßt ihn 8 - 10 Stunden in der Kammeratmosphäre hängen und senkt ihn dann durch Hinunterschieben des herausragenden Glasstabes nach unten bis er in die mobile Phase eintaucht. Die Laufzeit bei dieser Papierchromatographie nach der aufsteigenden Methode beträgt für eine Strecke von 20 bis 25 cm ungefähr 5 - 6 Stunden. Nach Herausnahme der Bögen werden sie an der Luft vorgetrocknet und die Alkaloidflecke durch

UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auftrennung der Alkaloide der Ergotoxingruppe geschieht in analoger Weise. Die aus gleichen Volumenteilen wie oben beschrieben hergestellte mobile Phase muß mit Ameisensäure auf ein p_H von 4,0 eingestellt werden.

Aufarbeitung der aus den Großversuchen
gewonnenen Alkaloidkonzentrate.

Reinigung und Isolierung, sowie Identifizierung
der einzelnen Alkaloide.

1. Großversuch

Wuchsperiode: 8. Oktober - 26. November 1952

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Trockenmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung: im Mycel:
DK 011	200	197	1,003 kg	1,46 mg% 0,061 %

- a) Aus 28 Litern Kulturfiltrat wurde ein Rohalkaloidextrakt mit einem Blauwert von 90 mg Ergotamin gewonnen. Zur Reinigung wurde dieser nach Lösen in Methylenchlorid über Aluminiumoxyd (nach Brockmann) chromatographiert und unter Zusatz von 1 % Äthanol eluiert.

Im Eluat konnte die Verbindung aus Äthanol und Aceton kristallisiert werden (Abb. 44 und 45).

- b) Aus dem Trockenmycel wurde nach ammoniakalischer Methylenchloridextraktion ein Rohextrakt mit einem 250 mg Ergotamin entsprechenden Blauwert gewonnen. Nach Lösen in Äther-Petroläthermischung wurde der Wirkstoff mit 5 %iger wässriger Weinsäure ausgeschüttelt, diese sodaalkalisch gestellt und mit insgesamt 350 ml Methylenchlorid anteilsweise ausgeschüttelt. Der aus der organischen Phase gewonnene Rückstand kristallisierte aus Methanol in länglichen Fünfecken (Abb. 46) und aus Äthanol in prismatischen Kristallen (Abb. 47).

Die aus Methanol erhaltenen Kristalle zeigten einen Schmelzpunkt von 220° (Zersetzung).

Im Rundfilterchromatogramm fluoreszierte die Substanz aus dem Mycel deutlich nahe der Lösungsmittelfront mit dem R_F -Wert der bekannten wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide ($R_F = 0,95 - 0,96$). Daneben war noch ein gelblich fluoreszierender Ring mit $R_F = 0,65$ und ein violett fluoreszierender mit $R_F = 0,55$ zu beobachten.

2. Großversuch

Bezeichnung: V 125

Wuchsperiode: 19. Juni - 25. August 1953

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Trockenmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung:	im Mycel:
K 90	290	268	1,170 kg	0,5 mg%	Spuren

Auch in diesem Versuch wurde das abgeerntete Mycel an der Luft getrocknet. Dabei wurde ein eigenartiger Geruch beobachtet, der auf postmortale Veränderungen des Mycels schließen ließ. Die Extraktion einer Probe des getrockneten Mycels ergab einen so geringen Blauwert, daß nur noch Spuren von Wirkstoff vorhanden sein konnten. Infolgedessen wurde von einer Aufarbeitung der Nährlösung bzw. des Trockenmycels abgesehen.

3. Großversuch

Bezeichnung: V 141-142

Wuchsperiode: 14. Juli - 7. September 1953

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Feuchtmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung:	im Mycel:
K 90	420	80	2,65 kg (= 360 g Trockenmycel)	0,82 mg%	0,03 %

Nach erschöpfender Extraktion des Feuchtmycels, wobei 5,68 Liter weinsaures methanolisches Perkolat erhalten wurden. Eine Blauwertsbestimmung ergab 22,5 Gamma/ml, was einer Gesamtmenge von 130 mg Wirkstoff, berechnet als Ergotamin, entspricht.

Nach Alkalisieren, Ausschütteln mit Methylenchlorid, Abziehen des Lösungsmittels, Aufnehmen des Rückstandes in Äther-Petroläthermischung und Ausschütteln dieser mit 5 %iger Weinsäure, konnte in insgesamt 100 ml Weinsäurelösung der Blauwert mit 112,5 mg ermittelt werden. Diese Lösung wurde nach ammoniakalisieren anteilsweise mit insgesamt 80 ml Methylenchlorid ausgezogen, zur Trockne gebracht, mit 10 ml trockenem Methylenchlorid aufgenommen und über der 50-fachen Menge Aluminiumoxyd (nach Brockmann) chromatographiert. (5,5 g Aluminiumoxyd nach Brockmann werden mit 20 ml Methylenchlorid angeschlämmt und in eine gläserne Perkulationsröhre mit den gleichen Maßen, wie sie zur Extraktion und quantitativen Alkaloidbestimmung der Trockenmycelien Verwendung finden, gegeben.) Nachdem sich das Adsorbens abgesetzt hatte, betrug die Höhe der Aluminiumoxydsäule 5 cm. Nach Einsickern des reinen Lösungsmittels wurde die Lösung des Wirkstoffes in den 10 ml Methylenchlorid aufgegeben. Nach Eindringen dieser Lösung wurde mit reinem Methylenchlorid eluiert. Unter der Quarzlampe wurde eine blau fluoreszierende, langsam wandernde Zone beobachtet, welche die Alkaloide enthalten mußte, da ein Tropfen davon eingedunstet und mit Eisessig aufgenommen eine sehr starke Blaufärbung mit dem Alkaloidreagenz erzeugte. Aus dem Eluat wurde das Lösungsmittel abdunsten lassen. Der lackartig glänzende gelbliche Rückstand wog 107 mg.

Kristallbilder:

Aus Äthanol kristallisierte die Substanz in prismatischen Kristallen (Abb. 48), aus Methanol erhielt ich teilweise langgestreckte Fünfecke (Abb. 49). Aus Aceton kristallisierten Nadeln und die bekannten abgerundeten Fünfecke des Ergotaminins (Abb. 50).

Polarisation:

$$[\alpha]_D^{20} = +116^\circ \quad (c = 0,5 \text{ in Chloroform})$$

Papierchromatographie:

Im Rundfilterchromatogramm erhielt ich die R_F -Werte der wasserunlöslichen Basen mit 0,95. (Abb. 51)

Im Segmentchromatogramm wurde Ergotaminin ($R_F = 0,67$) nachgewiesen.

4. Großversuch

Bezeichnung: V 180-183

Wuchsperiode: 3. September - 19. Oktober 1953

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Feuchtmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung:	im Mycel:
K 90	200	80	2,6 kg (= 400 g Trockenmycel)	0,83 mg%	nicht bestimmt

- 10,5 Liter Kulturfiltrat wurden aufgearbeitet, als Ausbeute konnten 3,3 mg Rohalkaloid gewonnen werden.
- Aus dem Feuchtmycel wurden etwas über 40 mg Rohalkaloid isoliert, das sich bei der chromatographischen Reinigung über der 50-fachen Menge Aluminiumoxyd auftrennte in zwei Fraktionen. Die 1. Fraktion ergab eine Ausbeute von 31,1 mg., die 2. Fraktion eine von 6,8 mg Alkaloid.

Kristallbilder:

Die Substanz aus der Nährlösung kristallisierte aus Aceton in dreieckigen Platten: Ergotaminin (Abb. 52). Das Alkaloid der 1. Fraktion aus dem Mycel kam aus Methanol in muschelförmigen Kristallaggregaten heraus (Abb. 53), aus Aceton erkannte man die Kristalle des Ergotaminins (Abb. 54 und 55). Die 2. Fraktion war nicht zu kristallisieren.

Papierchromatographie:

Im Rundfilterchromatogramm zeigte die Verbindung aus dem Kulturfiltrat den R_F -Wert der wasserunlöslichen Basen. Das gleiche ergab die 1. Fraktion aus dem Mycel.

Im Segmentchromatogramm zeigte der Wirkstoff aus der Nährlösung Ergotaminin neben Spuren von Ergotamin. Die 1. Fraktion erwies sich ebenfalls nach dieser Methode als Ergotaminin mit wenig Ergotamin verunreinigt.

Die 2. Fraktion verhielt sich demgegenüber papierchromatographisch abweichend. Im normalen Rundfilterchromatogramm zeigte die Verbindung einen stark fluoreszierenden Ring mit $R_F = 0,8$ (Abb. 56). Im Segmentchromatogramm waren von außen nach innen schwach positiv zu erkennen: Ergotamin und Ergotaminin. Außerdem wurde noch ein stark fluoreszierender Fleck mit $R_F = 0,2$ beobachtet, der vermutlich von der gleichen Substanz, die im Rundfilterchromatogramm $R_F = 0,8$ aufwies, herrühren könnte (Abb. 57).

5. Großversuch

Bezeichnung: V 240-242

Wuchsperiode: 16. November - 28. Dezember 1953

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Feuchtmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung: im Mycel:	
K 90	400	170	3,4 kg (= 440 g Trockenmycel)	0,8 mg%	0,04 %

Das Kulturfiltrat wurde wegen des geringen Alkaloidgehaltes nicht aufgearbeitet.

Nach der üblichen Aufarbeitungsmethode konnte aus dem Feuchtmycel 164 mg Rohalkaloid gewonnen werden.

Versuch der Identifizierung des Rohalkaloidgemisches:

Aus 90 % Äthanol bzw. Methanol kristallisierte die Substanz kegelförmig (Abb. 58). Aus Aceton erhielt ich die dreieckigen Platten, wobei die dritte Seite meist etwas unscharf schien (Abb. 59).

Die Schmelzpunktsbestimmungen dieser Kristallisate ergaben Zersetzungspunkte zwischen 236° - 238° .

Im Rundfilterchromatogramm erschien die Substanz mit $R_F = 0,95 - 0,96$.

Im Segmentchromatogramm konnte ich hauptsächlich Ergotaminin neben wenig Ergotamin erkennen.

Die polarimetrische Bestimmung ergab:

$$[\alpha]_D^{20} = +284^{\circ} \quad (c = 0,25 \text{ in Chloroform}).$$

Chromatographische Trennung des Rohalkaloidgemisches:

125 mg Rohalkaloid wurden unter gelinder Wärme in 10 ml Methylenchlorid gelöst, filtriert, mit 5 ml Methylenchlorid KÖlbchen und Filter nachgespült und auf eine Aluminiumoxydsäule (20 g) gegeben. Nach Einsickern der Alkaloidlösung wurde weiter mit trockenem Methylenchlorid eluiert. Das Alkaloidgemisch konnte an der Säule in zwei Substanzen zerlegt werden (Fraktion 2 und 4), die es gelang zu identifizieren. Fraktion 2 bestand aus Ergotaminin und Fraktion 4 erwies sich als Ergotamin, verunreinigt mit Spuren einer unbekannten Verbindung.

Fraktionen:	Menge:	Blauwert:	α_D^{20} :	Rückstand:	daraus ber. $[\alpha]_D^{20}$
1	6 ml	4,8 mg	-	5,5 mg	-
2	16,5 ml	80,0 mg	$+2,08^{\circ}$	85,2 mg	$+378^{\circ}$
3	3,0 ml	1,75 mg	-	2,5 mg	-
4	35,0 ml	18,7 mg	$-0,1^{\circ}$	19,5 mg	-179°

Identifizierung von Fraktion 2:

Fraktion 2 kristallisierte aus Methanol und aus Aceton in drei- und fünfeckigen Platten.

Das Kristallisat zeigte den Zersetzungspunkt $232 - 235^{\circ}$.

Im Segmentchromatogramm wurde für die Fraktion 2 Ergotaminin gefunden. Das Papierchromatogramm nach K. Macek zeigte ebenfalls nur Ergotaminin.

Identifizierung von Fraktion 4:

Fraktion 4 war nicht kristallisierbar. Eine Probe des Eluats wurde zur Trockne eingeengt. Der Rückstand zeigte einen Zersetzungspunkt von $159 - 161^{\circ}$.

Im Segmentchromatogramm fand ich hauptsächlich Ergotamin neben Spuren von Ergotaminin. Außerdem waren noch 2 fluoreszierende Flecken mit $R_F = 0,62$ und $0,69$ zu erkennen.

Im Rundfilterchromatogramm zeigte sich deutlich ein fluoreszierender Ring mit $R_F = 0,9$. Daneben noch ein weiterer Ring mit schwächerer Fluoreszenz ($R_F = 0,66$).

Papierchromatogramm nach K. Macek:

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:			
Ergotamin	0,2	(0,53)		
Ergotaminin	(0,18)	0,56		
Ergocristin			0,7	(0,92)
Ergocristinin				0,94
Fraktion 4	0,19	(0,5)	(0,63)	

In Klammern gesetzte R_F -Werte bedeuten nur schwache Fluoreszenz.

6. Großversuch

Bezeichnung: V 261-262

Wuchsperiode: 8. Januar - 22. Februar 1954

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Feuchtmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung: im Mycel:	
K 90	150 Hauptversuch	137 = 91 %	zusammen 2,44 kg (= 365 g Trockenmycel)	0,95 mg%	nicht ermittelt
	50 Kontrolle	41 = 82 %		0,5 mg%	

Das Kulturfiltrat wurde nicht aufgearbeitet. Aus dem Feuchtmycel wurde nach weinsaurer methanolischer Extraktion und Ausschütteln mit Methylenchlorid ein Rohalkaloidkonzentrat gewonnen, das über eine Kurzsäule von Aluminiumoxyd vorge-reinigt wurde. Das Eluat wurde bei Zimmertemperatur bis auf einige Milliliter eingengt und dieses Konzentrat unter Turbinieren in 50 ml Petroläther eingegossen. Das ausgefallene Alkaloidgemisch war gelbweiß. Ausbeute: 413 mg.

Eine polarimetrische Bestimmung ergab:

$$[\alpha]_D^{20} = +358^{\circ} \quad (c = 0,4 \text{ in Chloroform}).$$

Chromatographische Trennung des Rohalkaloidgemisches:

305 mg Rohalkaloidgemisch wurden unter Erwärmen in 30 ml Methylenchlorid gelöst und filtriert. Kölbchen und Filter wurden mit 6 ml Lösungsmittel nachgewaschen und die Alkaloidlösung auf eine Aluminiumoxydsäule (50 g) gegeben. Nach Einsickern der Lösung betrug die Tiefe der unter der Quarzlampe fluoreszierenden Zonen 7,5 cm, bei einer Säulenhöhe von 15,5 cm. Nach Zugabe weiteren Lösungsmittels zum Eluieren wanderte die Zone langsam nach unten und trennte sich ab Säulenmitte auf in eine hellblau fluoreszierende Zone mit relativ hoher Wanderungsgeschwindigkeit und eine langsam eluierbare schmalere Zone.

Fraktion:	Menge:	Blauwert:	α_D^{20} :	Rückstand:	daraus ber. $[\alpha]_D^{20}$
1	18 ml	4,2 mg	+0,65°	7,3 mg	-
2	84 ml	185,0 mg	+1,07°	259,3 mg	+346°
3	36 ml	1,9 mg	+0,05°	3,4 mg	-
4	12 ml	0,3 mg	+0,08°	2,2 mg	-
5	105 ml	21,0 mg	+0,03°	19,5 mg	-
6	48 ml	1,7 mg	-0,06°		

Aus den Rückständen der einzelnen Fraktionen ergibt sich, daß allein Fraktion 2 85 % der eingesetzten Ausgangsmenge enthält.

Fraktion 1 zeigte mit dem Aldehydreagenz nur eine schwache Blaufarbe und wurde verworfen, ebenso die Fraktionen 3 und 4.

Fraktion 2 wurde in einer kleinen Kristallisierschale in Methylenchlorid gelöst und mit Methanol versetzt. Schon nach kurzer Zeit kristallisierte die Substanz in fünfeckigen Platten aus, wobei eine Ecke stark abgerundet erschien (Abb. 60). Wenig später erschienen auch strahlig angeordnete Nadelbüschel zwischen den Kristallen des Ergotaminins (Abb. 61). Fraktion 5 und 6 wurden nach Lösen in Aceton vereinigt. Der Rückstand ergab 19,5 mg (6,5 % der ursprünglichen Menge).

Chromatographische Trennung von Fraktion 2:

250,9 mg von Fraktion 2 wurden in 30 ml Methylenchlorid unter Erwärmen gelöst und filtriert. Kölbchen und Filter wurden mit 6 ml Lösungsmittel nachgespült und die vereinigten Lösungen über 41,5 g Aluminiumoxyd chromatographiert.

Fraktion:	Menge:	Blauwert:	α_D^{20} :	Rückstand:	daraus ber. $[\alpha]_D^{20}$
2 a	11 ml	35,6 mg	+1,41°	36,4 mg	+387°
2 b	65 ml	186,0 mg	+1,12°	206,1 mg	+348°

Aus Fraktion 2 a kristallisierte mit Methylenchlorid und Methanol die fragliche Substanz in Nadeln, strahlig büschelweise zusammengelagert aus. Das Kristallisat aus Fraktion 2 b erwies sich als Ergotaminin (Abb. 62).

Aus beiden Kristallisaten wurde je ein Kristall herauspräpariert und auf dem Objektträger unter der Stereolupe durch vorsichtige seitliche Zugabe von einigen Tropfen Methanol, die auf der anderen Seite mittels eines Filtrierpapierstreifens wieder weggesaugt wurden, gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Schmelz- bzw. Zersetzungspunkt ermittelt. Während die Nadeln einen Schmelzpunkt unter Zersetzung zwischen 228° - 230° hatten, zersetzte sich das Ergotaminin zwischen 230° und 238° .

Papierchromatographische Identifizierung
der Fraktionen 2 a und 2 b:

1. Fraktion 2 a

a) Bogenchromatogramm nach K. Macek

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:			
Ergotamintertrat	0,09	(0,36)		
Ergotamin	0,1	(0,4)		
Ergotaminin		0,4		
Ergocristin			0,68	(0,95)
Ergocristinin			(0,78)	(0,95)
Fraktion 2 a	(0,1)	(0,4)	(0,73)	(0,95)

b) Bogenchromatogramm nach A. Stoll

mobile Phase: Ergotoxintrennungsgemisch

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:			
Ergotamin				0,83
Ergocristin	(0,13)		0,51	
Fraktion 2 a	0,13	(0,22)	(0,51)	(0,75)

mobile Phase: Ergotamintrennungsgemisch

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:	
Ergotamin	(0,45)	0,57
Ergotaminin		0,47
Ergocristin	0,37	
Ergocristinin	0,09	
Fraktion 2 a	0,09	(0,48)

2. Fraktion 2 b

a) Bogenchromatogramm nach K. Macek

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:	
Ergotamintartrat	0,09	(0,36)
Ergotamin		0,4
Fraktion 2 b	(0,09)	0,44

b) Bogenchromatogramm nach A. Stoll

mobile Phase: Ergotamintrennungsgemisch

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:	
Ergotamintartrat	(0,53)	0,72
Fraktion 2 b	0,5	(0,7)

Umlagerung von Fraktion 2 b zu Ergotaminsulfat:

100 mg von Fraktion 2 b wurden in 2 ml Methylenchlorid in einem Mikrobecherglas suspendiert und vorsichtig zum Sieden erwärmt. Nach sofortigem Zusatz von 0,16 ml Eisessig wurde die Lösung fast klar und weiter erwärmt bis alles Methylenchlorid verdunstet war. Nach Zugabe von 0,82 ml methanolischer Schwefelsäure (1 %) wird über Nacht zum Auskristallisieren stehen lassen. Das ausgefallene Kristallisat wurde

abgenutscht, mit Methanol und Äther gewaschen und anschließend getrocknet. Ausbeute: 49 mg Ergotaminsulfat = 45,3 % d. Th. Schmelzpunkt: 202 - 204° (Zersetzung).

Durch Einengen der Mutterlauge konnte noch eine 2. Fraktion von 14,7 mg gewonnen werden (Abb. 63). Gesamtausbeute: 63,7 mg = 59 % d. Th.

Freisetzung und Identifizierung der Base:

49 mg des Sulfates wurden in einem kleinen Scheidetrichter mit 75 mg Natriumbicarbonat und 3,7 ml Wasser versetzt, gut durchgeschüttelt und viermal mit je 2 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden durch ein mit Chloroform befeuchtetes Faltenfilter in ein 10 ml-Meßkölbchen filtriert und mit reinem Chloroform bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wurde in ein 20° warmes Wasserbad für 10 Minuten gestellt und anschließend polarisiert. Der Drehungswinkel betrug

$$\alpha_D^{20} = -0,46^\circ \quad (l = 1 \text{ dm})$$

Nach Ermittlung des Drehwertes wurde die Chloroformlösung über 8,0 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Sie erwies sich als einheitlich. Im Eluat wurde nach Verdunsten des Lösungsmittels der Rückstand mit 31,6 mg ermittelt.

Aus dem Rückstand und dem Drehwert ergibt sich

$$[\alpha]_D^{20} = -145^\circ \quad (c = 0,316 \text{ in Chloroform})$$

Der Rückstand von 31,6 mg Ergotamin wurde in wenig Methylenchlorid gelöst und mit 2 ml 90 %igem Aceton versetzt. Nach kurzem Stehen kristallisierte die Aceton-Wasser-Verbindung des Ergotamins in charakteristischen kurzen dicken Prismen (Abb. 64 und 65). Schmelzpunkt der Kristalle: 169 - 172° (Zersetzung).

Chromatographische Auftrennung von Fraktion 5 und 6:

19,5 mg Rückstand von Fraktion 5 und 6 konnten an 3,0 g Aluminiumoxyd in Ergotaminin (Abb. 66) und 8,5 mg Ergotamin zerlegt werden. Aus Aceton wurden die typischen Kristalle

der Aceton-Wasser-Verbindung des Ergotamins erhalten (Abb. 67 und 68).

Papierchromatographischer Nachweis des Ergotamins:

Bogenchromatogramm nach K. Macek

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:
Ergotamin	0,11 (0,4)
Ergotaminin	0,4
Ergotamin aus Ergotaminin über Sulfat (Fraktion 2 b)	0,11 (0,43)
Ergotamin aus Fraktion 5 und 6	0,11 (0,42)

7. Großversuch

Bezeichnung: V 265-266

Wuchsperiode: 24. Februar - 5. April 1954

Stamm:	Anzahl der Kolben:	davon als brauchbar abgeerntet:	Ausbeute an Trockenmycel:	Alkaloidgehalt in der Nährlösung:	im Mycel:
Ho	100 Reihe A	82	232 g	0,9 mg%	0,05 %
Ho	100 Reihe B	89	250 g	0,9 mg%	0,08 %

Aus dem vereinigten Trockenmycel beider Versuchsreihen gelang es, 250 mg an Rohalkaloid zu isolieren. Es kristallisierte aus Äthanol in bootförmigen, beiderseits zugespitzten Prismen (Abb. 71 und 72) und aus Aceton in langen spitzen Nadeln (Abb. 73 und 74).

Die Kristalle schmolzen unscharf unter Zersetzung zwischen 218° und 221°.

Überführung des Rohalkaloids in Ergocristinphosphat:

a) Vorversuch

50 mg Rohalkaloid wurden in 1 ml methanolischer Phosphorsäure (1 %) in einem Mikrobecherglas in der Wärme gelöst und 15 Minuten am Sieden gehalten unter laufender Ergänzung des verdampfenden Alkohols. Im Kühlschrank erstarrte der Inhalt in kurzer Zeit zu einem Kristallbrei. Dieser wurde abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Eine Probe aus Methanol (90 %) umkristallisiert, zeigte viereckige Platten (Abb. 75), deren Konturen nach 24 Stunden unscharf wurden (Abb. 76). Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei $185 - 187^{\circ}$ (Zersetzung).

b) Reinigung des Rohalkaloids

133 mg Rohalkaloid wurden in 5 ml Methylenchlorid gelöst und mit 20 ml Äther p. n. verdünnt. Diese Lösung wurde achtmal mit je 10 ml 5 %iger wässriger Weinsäure ausgeschüttelt. In den vereinigten weinsäuren Ausschüttelungen (83 ml) wurde der Blauwert mit 114 mg Ergotamin = 120 mg Ergocristin bestimmt. Aus der weinsäuren Lösung wurde mit 10 %igem Ammoniak die Base gefällt, mit ammoniakalischem Wasser gewaschen, getrocknet und gewogen.

Ausbeute: 124,9 mg.

c) Umlagerung von Ergocristinin in Ergocristinphosphat

100 mg des gereinigten Alkaloids wurden in 1,25 ml alkoholischer Phosphorsäure (3,5 %) suspendiert und eine halbe Stunde am Rückfluß gekocht. Danach wurde zur Kristallisation beiseite gestellt, die ausgefallenen Kristalle abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 65,4 mg = 56 % d. Th.

Eine kleine Menge davon aus Äthanol (90 %) umkristallisiert, zeigte neben rhombischen Platten mit Querspalt, die in der Literatur beschriebenen Sechsecke (39), sowohl

langgestreckt mit scharfen Konturen (Abb. 77), als auch mit abgerundeten Ecken (Abb. 78).

Der Schmelzpunkt des Phosphates wurde bei $186 - 187^{\circ}$ unter Zersetzung gefunden.

Papierchromatographische Identifizierung des Ergocristinphosphates:

a) Bogenchromatogramm nach A. Stoll

mobile Phase: Ergotoxintrennungsgemisch

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:
Ergocristin der Firma A	0,68
Ergocristin der Firma B	0,69
Ergocristinphosphat der Firma B	0,68
Ergocristinphosphat aus Ergocristinin V 265-266	0,69

b) Bogenchromatogramm nach K. Macek

aufgetragene Substanzen:	gefundene R_F -Werte:
Ergocristin der Firma B	0,68 (0,95)
Ergocristinphosphat aus Ergocristinin V 265-266	0,6 (0,92)

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S
=====

- 1) B. Meyer: Landwirtsch. Jahrb. 17, 924, (1888)
- 2) O. Brefeld: Unters. aus d. Ges.Geb. d. Mykologie
H. 10, 192, (1891)
- 3) C. Engelke: Beiblatt "Hedwigia" 51, 221, (1902)
- 4) W.W. Bonns: Am. J. Bot. IX, 339, (1922)
- 5) L. Hecke: Schweizer Apoth. Z. 60, 45, (1922)
- 6) R. Falck: Pharm. Ztg. 67, 777, (1922)
- 7) H. Kirchhoff: Zentralbl. f. Bakt. II, 310, (1929)
- 8) A. McCrea: Am. J. Bot. XVIII, 50, (1931)
- 9) H. Kreitmair u. W. Küssner: Biochem. Ztschr.
239, (1931)
- 10) R. Jaretsky: Arch. Phar. 273, 348, (1935)
- 11) H.W. van Urk: Pharm. Weekbl. 66, 473, (1929)
- 12) G. Krebs: Diss. Zürich (1936)
- 13) G. Schweizer: Phytopatholog. Ztschr.
XIII, 317, (1941)
- 14) S.J. Ritzema: Diss. Groningen (1943)
- 15) E. Baldacci: Farmaco Sci. e tec. 1, 110, (1946)
- 16) H.D. Michener u. N. Snell: Am. J. Bot.
XXXVII, 52, (1950)
- 17) K. Ogiu u. H. Shimamoto: Jap. J. Pharmacol.
1, 35, (1951)
- 18) M. Abe: J. Agr. Chem. Soc. Japan 22, 2, (1948)
Jap. Patent 178 336 v. 31.III.1949
Annual rep. of the Takeda Research Lab.
X, 73, (1951)
- 19) S.K. Sim u. H.W. Youngken: J. Am. Pharm. Ass.
XL, 434, (1951)
- 20) V.E. Tyler u. A.E. Schwarting:
J. Am. Pharm. Ass. XLI, 590, (1952)

- 21) V.E. Tyler u. A.E. Schwarting:
J. Am. Pharm. Ass. XLIII, 207, (1954)
- 22) M. Abe, T. Yamano, Y. Kozu u. M. Kusumoto:
J. Agr. Chem. Soc. 25, 458, (1952)
- 23) L. Niedermaier: Diss. Erlangen (1953)
- 24) M.L. Berman u. H.W. Youngken jr.:
J. Am. Pharm. Ass. XLIII, 200, (1954)
- 25) A.G. Paul, W.J. Kelleher u. A.E. Schwarting:
J. Am. Pharm. Ass. XLIII, 205, (1954)
- 26) A.R. Patton, E.G. Hill u. A.M. Foreman:
Science 107, 623, (1948)
- 27) Th.M. v. Fellenberg: Mitt. Lebensmittelunters.
4, 248, (1913)
- 28) M. Abe: J. Agr. Chem. Soc. 24, 416, (1951)
- 29) E. Neuhoﬀ: Diss. Würzburg (1953)
- 30) S. Gordon u. K. Nieva: Arch. of Biochem.
20, 367, (1949)
- 31) G. Kessler: Diss. Mainz (1954)
- 32) A. Rippel-Baldes: Grundriß der Mikrobiologie,
Springer-Verlag,
Berlin u. Göttingen (1947)
- 33) K. Scharrer: Biochemie der Spurenelemente,
Verlag Paul Parey, Berlin (1948)
- 34) D.F. Boas: Pharmazie 7, 511, (1952)
- 35) G. Beadle u. E. Tatum: Am. J. Bot.
XXXII, 678, (1945)
- 36) D.R. Hoagland: Bot. Rev. 3, 307, (1937)
- 37) K. Macek, A. Cerny u. M. Semonsky: Pharmazie
9, 388, (1954)
- 38) A. Stoll u. A. Rüegger: Helv. Chim. Acta
37, 1725, (1954)
- 39) A. Stoll u. E. Burckhardt: Hoppe Seyler's Ztschr.
250, 1, (1937)
- 40) A. Stoll, A. Brack, H. Kobel,
A. Hofmann u. R. Brunner: Helv. Chim. Acta
37, 1815, (1954)
- 41) W. Merz: Diss. Mainz (1955)

LEBENS LAUF

Am 7. Juni 1922 bin ich als Sohn des Studienrates Dr. phil. Wilhelm Rassbach und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Hauck, in Wiesbaden geboren. Von 1928 bis 1932 besuchte ich dort die Volksschule an der Hebbelstraße und von Ostern 1932 das Städt. Reform- und Realgymnasium, das ich auf Grund meiner Einberufung zur Wehrmacht im März 1940 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Nach meiner Rückkehr aus der Kriegsgefangenschaft im Herbst 1945 studierte ich zunächst 4 Semester Chemie an der Johann-Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt und trat im Herbst 1947 in die Goten-Apotheke in Wiesbaden als Praktikant ein. Im Frühjahr 1949 absolvierte ich das pharmazeutische Vorexamen und begann im Sommer-Semester 1949 mein pharmazeutisches Studium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Zu Beginn des Jahres 1952 bestand ich die Pharmazeutische Prüfung. Im Anschluß daran erhielt ich am Pharmazeutischen Institut eine Hilfsassistentenstelle und begann mit der Bearbeitung des vorliegenden Themas. Seit dem 1. Oktober 1953 bin ich mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle betraut.

